



**Ana Raquel Azevedo
Ferreira Martins**

**Degradação do edificado por colonização biológica-
Avaliação da eficácia de biocidas**



**Ana Raquel Azevedo
Ferreira Martins**

**Degradação do edificado por colonização biológica-
Avaliação da eficácia de biocidas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Luísa Lomelino Velosa, Professora Associada do Departamento de Engenharia Civil da Universidade de Aveiro e coorientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Investigador Principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Prof. Doutor Joaquim Miguel Gonçalves Macedo
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Eduarda Maria Martins Moreira da Silva Vieira
Professora Auxiliar da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional do Porto (arguente)

Prof. Doutora Ana Luísa Pinheiro Lomelino Velosa
Professora Associada c/ agregação, da Universidade de Aveiro (orientadora).

agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Velosa, pela sua orientação e partilha de conhecimento, pela sua disponibilidade, incentivo e constante acompanhamento do trabalho realizado.

Ao Professor Doutor Artur Alves pela sua coorientação e partilha de conhecimento e pela sua disponibilidade.

À empresa Xprektaltek, mais concretamente ao Dr.João Dias, Dr.Carlos Aguiar e Dr.António Cardoso pela colaboração fulcral, disponibilidade e acompanhamento no trabalho realizado.

Ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro em especial à Doutora Anabela Lopes, pela ajuda na realização dos trabalhos laboratoriais.

À Fundação de Mata do Buçaco pela sua receptividade, por terem garantido as condições necessárias para a realização deste trabalho, pela partilha de conhecimento e disponibilidade.

A todos os meus amigos, pelo seu carinho, apoio, incentivo, especialmente à Cláudia Jesus, Marco Costa e Miguel pelo apoio fulcral.

Por último, aos meus avôs, Eloy e Luísa, à minha tia Luisa, aos meus pais, Eloy e Dolores, aos meus irmãos, pelo seu incentivo, compreensão, apoio, força e carinho. Este momento é dedicado a vocês.

palavras-chave

biocidas, Buçaco, fungos, bactérias, halos de inibição, leitura espectral, pedra, conservação, reabilitação

resumo

A biodeterioração de monumentos e edifícios históricos, esculturas em pedra e qualquer artefacto pétreo causada por microrganismos é uma das grandes preocupações dos conservadores. O caso de estudo da presente dissertação localiza-se na Mata Nacional do Buçaco, esta que apresenta uma grande riqueza e diversidade quer no património edificado, quer no património natural. O principal objetivo deste trabalho foi estudar formas de avaliar a atuação e eficácia de biocidas no contexto da conservação do património edificado. Para além da aplicação direta dos biocidas em áreas de estudo selecionadas em edifícios da Mata Nacional do Buçaco, para uma monitorização e controlo da atuação dos mesmos, também foram retiradas amostras de fungos e bactérias para serem isolados, e posteriormente caracterizados para uma avaliação em laboratório à atuação dos biocidas, através da medição de halos de inibição. Paralelamente foi feito um estudo com leituras espectrais em placas de Petri com fungos isolados retirados de um dos pilares do Hotel Palácio, e leituras espectrais em amostras de rocha dolomítica, rocha esta utilizada na construção do Hotel Palácio, para poder haver uma avaliação da aplicabilidade ou não, da imagem multiespectral na avaliação da actuação de biocidas. Foram obtidos valores através de dados espectrais que podem levar a crer quando a atuação do biocida é positiva ou negativa na eliminação de determinado fungo.

keywords

Biocides, Buçaco, fungi, bacteria, inhibition halos, spectral reading, stone, conservation, rehabilitation

abstract

The biodegradation of monuments and historical buildings, stone sculptures and any stony artifact caused by microorganisms it's one of the main concerns of architectural conservators-restorers. The case study of the present dissertation is located in Buçaco's national forest, which houses a great wealth and diversity both in built heritage and natural heritage. The main objective of this study was to research and develop methods to evaluate the action and efficiency of biocides on the conservation of edified heritage. In addition to the direct application of the biocides to selected study areas of Buçaco's national forest, and in order to monitor and control the performance of said biocides, samples of fungi and bacteria were also collected to be isolated and later characterized in a laboratory evaluation of the biocides performance, through measurement of inhibition halos. In parallel, another experiment was carried out aiming to evaluate the applicability of the use of multispectral imaging on the evaluation of the performance of biocides. For this experiment, multispectral imaging was performed on Petri dishes containing isolated fungi taken from one the pillars of the Palácio Hotel and on samples of dolomite rock – the rock used in the edification of the Palácio Hotel.

Values were obtained through spectral data that may lead to the belief that the action of the biocide is positive or negative, in terms of the elimination of a certain fungus.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	vii
1. Introdução	3
1.1. Enquadramento	3
1.2. Objetivos	4
Estrutura e organização da dissertação	4
1.3.	4
2. Biodeterioração de Edifícios Antigos	9
3. O uso de Biocidas	15
3.1. A Classificação de Biocidas	16
3.2. Considerações a ter na seleção de um biocida	17
3.3. Fatores que interferem com a eficácia de um biocida	18
3.4. A aplicação de biocidas	18
3.5. Considerações Ambientais	20
4. Tratamento com biocidas	25
4.1. Área de Intervenção: Pedra	25
4.1.1. Biocidas selecionados	26
4.1.2. Método de Aplicação	27
4.1.3. Resultados de eficácia	27
4.2. Área de Intervenção: Argamassa	28
4.2.1. Biocidas selecionados	28
4.2.2. Método de Aplicação	30
4.2.3. Resultados de eficácia	31
4.3. Área de Intervenção: Azulejos	33
4.3.1. Biocidas selecionados	33
4.3.2. Método de Aplicação	34
4.3.3. Resultados de eficácia	34
5. Caso de estudo	39
5.1. Convento de Santa Cruz, Ermidas, Via sacra e Hotel Real da Mata Nacional do Buçaco	39
5.1.1. Estado de conservação do edificado	46
5.2. Enquadramento geográfico	47
5.3. Clima da Mata do Buçaco	48
5.4. Bioclimatologia da Mata do Buçaco	48
5.5. Técnicas de construção	50
6. Trabalho de Campo	57
6.1. Identificação do tipo de Colonização Biológica	57
6.2. Recolha de amostras	62
6.3. Isolamento e meios de cultura	66
6.4. Biocidas selecionados	69
6.5. Testes aos biocidas	71
6.6. Testes aos biocidas <i>in situ</i>	73
7. Análise multiespectral	79
7.1. Enquadramento	79
7.2. Imagem Multiespectral	79

7.2.1.	Sistema XpeCAM X01	82
7.2.2.	Leitura espectral nas placas de fungos	83
7.2.2.1.	Metodologia laboratorial	83
7.2.2.2.	Obtenção e Interpretação de resultados	86
7.2.3.	Leitura espectral nas amostras de Rocha dolomítica.....	88
7.2.3.1.	Metodologia laboratorial	88
7.2.3.1.	Obtenção e Interpretação de resultados	89
8.	Conclusão	95
	Referências Bibliográficas.....	101
	Anexos.....	105

Índice de Figuras

Figura 1. Locais de recolha de amostras (Dina M.R. Mateus et al.,2003)	25
Figura 2. Locais de recolha de amostras: A) Base da coluna esquerda b) Base da coluna direita (Dina M.R. Mateus et el., 2013).	26
Figura 3. a) Placas cultivadas com microrganismos b) Exemplo ilustrativo de um halo de inibição de crescimento provocado por um disco embebido em biocida (Dina M.R.Mateus et al.,2013).	27
Figura 4. Localização da 1ª zona seleccionada, no Pátio dos Arcos, no Palácio Nacional da Pena (Fonseca, 2009).	30
Figura 5. Localização da 2ª zona seleccionada no Terraço D. Carlos, no Palácio Nacional da Pena (Fonseca, 2009).	31
Figura 6. Pátio dos Arcos: a) Antes do tratamento b) após o tratamento	32
Figura 7. Terraço de D. Carlos: a) Antes do tratamento b)Após o tratamento.	32
Figura 8. Registo fotográfico do efeito cada tratamento aplicado sobre os biofilmes acastanhadas em azulejos vidrados da Casa da Pesca após 4 e 6 meses (Coutinho, 2015).	35
Figura 9 – a) Planta do Convento de Santa Cruz. (Monumentos, 2013); b) Portaria do Convento. (Camara da mealhada, 2013)	41
Figura 10 - Hotel Palace Bussaco; (http://www.booking.com/hotel/pt/palace-do-bussaco.pt-pt.html)	42
Figura 11 - Ermida de S. José.	43
Figura 12 – a) Fachada principal da ermida do Calvário; b) Planta e corte da ermida do Calvário; b) Planta e corte da ermida do Calvário; (Gomes, 2005) (Ferreira, 2014);	44
Figura 13 – Capela Via Sacra	45
Figura 14 – Varanda de Pilatos (Camara municipal da Mealhada, 2013)	45
Figura 15 . Enquadramento geográfico da MNB (adapt. da Carta de Localização (1/100 000, do POg da MNB, 2009) (Lopes, 2012)	47
Figura 16 - Mapa Macrobioclimas da Europa (S. Rivas - Martinez, A. Penas& T.E. Diaz (2004), http://www.ucm.es/info/cif/form/bi_map/index.htm), (Lopes, 2012);	49
Figura 17 – Bioclimas da Península Ibérica (Adap. de Bioclimas Map of europe. S. Rivas- Martinez, A. Penas&T.E. Diaz (2004), Lopes, 2012)	50
Figura 18 - a) Disposição das telhas nas Capelas e Ermidas de habitação; b) Disposição das telhas no Convento (Ferreira, 2014);	52
Figura 19 - Embrechados no muro da portaria	53
Figura 20 - Embrechados da porta de Coimbra, Convento de Santa Cruz, Bussaco (Luso Tapada do Buçaco, 2012)	53
Figura 21 - Teto da portaria do Convento executado em cortiça.	54
Figura 22 – Pilar exterior do Hotel; a) Extração de amostras na parte superior do pilar; b) extração de amostras na parte inferior do pilar;	63
Figura 23 – a) Escadas Hotel. Localização de extração de amostras; b) Extração de amostras;	64
Figura 24 - Portaria do Convento, localização da extração de amostras; a) extração de amostras;	64
Figura 25 – Capela 1 Via Sacra; a) extração de amostras da ombreira da porta da capela 1 via sacra, b) extração de amostras da parede da Capela 1 Via Sacra;	65
Figura 26 – Varanda de Pilatos, Capela 2 ; a) extração de amostras da ombreira da porta da capela 2 Via Sacra; b) extração de amostras da parede da Capela 2 Via Sacra;	65

Figura 27 - Exemplo de um riscado em placa. Fonte http://mansfield.osu.edu/~sabedon/biol4035.htm	67
Figura 28 - Halos de inibição; a) teste aos biocidas num isolado bacteriano; b) teste aos biocidas num isolado fúngico;.....	72
Figura 29 - Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados fúngicos.....	72
Figura 30 - Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas no diferentes isolados bacterianos.....	73
Figura 31 - Equicamento XpeCAM X01.....	82
Figura 32 - a) Placa com o fungo 1; b) Pormenor da seleção dos pontos da placa com o fungo 1.....	87
Figura 33 - a) Raspagem dos micélios do fungo <i>Cladosporium</i> sp. ; b) Água destilada estéril com os esporos; c) Mistura dos esporos do fungo com a água destilada estéril com o auxílio do Vortex;.....	88
Figura 34 - Metodologia do processo de colonização das rochas dolomíticas;.....	89
Figura 35 – Imagem multiespectral da rocha dolomítica sem colonização do fungo;	90
Figura 36 – Imagem multiespectral da rocha dolomítica com a aplicação do biocida HMK R162;	90
Figura 37 - Imagem multiespectral da rocha dolomítica com a aplicação do biocida Cloreto benzalcónico 50%;.....	91
Figura 38 - Imagem multiespectral da rocha dolomítica com a aplicação do biocida Algochene pronto ws;	91
Figura 39 – A. I. - Carta de Exposições da MNB com a localização da Mata Climácica, delimitada a verde. (Adapt. do POG da MNB, 2009).	109
Figura 40 – A. II - Carta de Altimetria da MNB com a localização da Mata Climácica, delimitada a verde. (Adapt. do POG da MNB, 2009).	113
Figura 41 – A.III. Carta Hipsométrica da MNB com a localização da Mata Climácica, delimitada a verde. (Adapt. do POG da MNB, 2009)	115
Figura 42 – A.V. a) Placa com o fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> sem aplicação de biocidas; b) Pormenor da seleção dos pontos da placa com o fungo 1	127
Figura 43 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> sem aplicação de biocidas;	127
Figura 44 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> sem aplicação de biocidas;	125
Figura 45 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> com aplicação de biocida HMK R162;.....	128
Figura 46 - A.V.Placa com o fungo 1- <i>Cladosporium cladosporioides</i> com a aplicação do biocida Algochene pronto ws, com a seleção de pontos;	126
Figura 47 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> com aplicação do biocida 2 – Algochene Pronto ws;.....	129
Figura 48 –A.V. Placa fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> com a aplicação do biocida 3 cloreto benzalcónico; b) Pormenor da seleção dos pontos;.....	127
Figura 49 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> com aplicação de biocida 3 Cloreto benzalcónico;	130
Figura 50 –A.V. Placas fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> activo sem aplicação de biocidas, com a seleção dos pontos (Elements);.....	129
Figura 51 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> sem aplicação de biocidas;.....	132

Figura 52 – A.V. Placa de Petri com o fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida HMK R162; seleção dos pontos (Elements);	130
Figura 53 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação de biocida HMK R162;	130
Figura 54 – A.V. Placa de Petri com o fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida Algochene pronto ws; seleção dos pontos (Elements);	131
Figura 55 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação de biocida Algochene pronto ws;	131
Figura 56 – A.V. Placa de Petri com o fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> com a atuação do biocida 3 Cloreto benzalcónico, com a seleção dos 8 pontos ;	132
Figura 57 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa de fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida 3 Cloreto benzalcónico ;	132
Figura 58 – A.V. Placa de Petri com o fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> sem aplicação de biocidas, com a seleção dos 8 pontos(Elements);	134
Figura 59 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> sem aplicação de biocidas;	134
Figura 60 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa de fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> com aplicação do biocida HMK R162 ;	135
Figura 61 – A.V. Placa fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> com a aplicação do biocida 31 - HMK R162K;	135
Figura 62 – A.V. Placa fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> com a aplicação do biocida 2 - Algochene pronto ws; b) Pormenor da seleção dos pontos ;	136
Figura 63 - Gráfico espectral relativo à placa de Petri com o fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> com aplicação do biocida Algochene pronto ws ;	136
Figura 64- A.V. Placa fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> com a aplicação do biocida 3 Cloreto benzalcónico;b) Pormenor da seleção dos pontos	137
Figura 65 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa de Petri com o fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> com aplicação do biocida Cloreto benzalcónico ;	137
Figura 66 - A.VI.Rocha dolomitica sem aplicação de biocidas;	141
Figura 67 - A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomitica sem aplicação de biocidas;	142
Figura 68- A.VI. Rocha dolomítica com aplicação do biocida HMK R162K;	143
Figura 69- A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomitica com aplicação de biocida HMK R162 ;	144
Figura 70- A.VI. Rocha dolomitica com aplicação de biocida Algochene pronto;	145
Figura 71- A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomitica com aplicação de biocida Algochene pronto ws ;	145
Figura 72- A.VI. Rocha dolomítica com aplicação de biocida Cloreto benzalcónico;	152
Figura 73 - A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomitica com aplicação de biocida Cloreto benzalcónico;	152

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais características dos biocidas (Dina M.R.Mateus et al.,2013).....	26
Tabela 2. Principais características dos biocidas (Fonseca, 2009).	29
Tabela 3 - Colonização biológica, Capela 1 Via Sacra;	58
Tabela 4 - Colonização biológica, Convento de Santa Cruz;	60
Tabela 5 - Colonização biológica, Varanda de pilatos, Capela 2;	61
Tabela 6 - Colonização Biológica, Palácio Hotel do Bussaco;	61
Tabela 7 - Designação e localização dos Isolados bacterianos;	67
Tabela 8 - Designação e localização dos isolados fúngicos;	68
Tabela 9 - Biocidas selecionados.....	70
Tabela 10 - Zonas de aplicação dos biocidas, imediatamente após a aplicação e após 1 mês; ..	74
Tabela 11 – Lista de filtros do sistema XpeCAM x01 e respetivos comprimentos de onda e largura de banda;	83
Tabela 12 - Placas Petri com 3 fungos diferentes sujeitas à atuação de 3 biocidas diferentes; ..	85
Tabela 13 - Correlações entre as placas de Petri com o fungo 1 Ativo/vivo e as placas do fungo 1 sujeitas à atuação dos biocidas: HMK, R162 Cloreto Benzalcónico e Algochene.	87
Tabela 14 - Correlações entre as placas de Petri com o fungo 2 ativo/vivo e as placas do fungo 2 sujeitas à atuação dos biocidas: HMK R162, Cloreto Benzalcónico e Algochene.	87
Tabela 15- Correlações entre as placas de Petri com o fungo 3 ativo/vivo e as placas do fungo 3 sujeitas à atuação dos biocidas: HMK R162, Cloreto Benzalcónico e Algochene.	87
Tabela 16 - Correlações efetuadas entre os dados obtidos das rochas dolomíticas com e sem atuação dos biocidas em estudo.....	92
Tabela 17– A.IV. Placas de Petri com os isolados fúngicos com os halos de inibição de cada um dos biocidas: HMK R162, Algochene pronto ws e Cloreto benzalcônico 50%;.....	118
Tabela 18 – A.IV. Placas de Petri com os isolados fúngicos com os halos de inibição de cada um dos biocidas: HMK R162, Algochene pronto ws e Cloreto benzalcônico 50%;.....	122
Tabela 19 – A.IV. Placas de Petri com os isolados fúngicos (Cont.) com os halos de inibição de cada um dos biocidas: HMK R162, Algochene pronto ws e Cloreto benzalcônico 50%;	123
Tabela 20 – A.V. Dados espectrais do fungo 1- <i>Cladosporium cladosporioides</i> sem actuação de biocidas;	127
Tabela 21 – A.V.Dados espectrais do fungo 1- <i>Cladosporium cladosporioides</i> com actuação do biocida HMK R162;	128
Tabela 22 – A.V.Dados espectrais do fungo 1- <i>Cladosporium cladosporioides</i> com actuação de biocida Algochene pronto ws;	129
Tabela 23 – A.V.Dados espectrais do fungo 1- <i>Cladosporium cladosporioides</i> com actuação de biocida Cloreto benzalcónico;	127
Tabela 24 – A.V.Quadro com as médias dos 8 pontos selecionados nas placas de Petri com o fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> ;	
Tabela 25 – A.V.Correlações efectuadas entre as placas de Petri com o fungo 1 activo (vivo) e com as placas de Preti com o fungo 1 sujeito à atuação dos 3 biocidas: HMK R162, CB – Cloreto benzalcônico 50%; Alg: Algochene Pronto ws	131
Tabela 26 – A.V. Dados espectrais fungo 2 - <i>Cladosporium Sp.</i> ativo sem aplicação de biocidas;.....	132

Tabela 27 – A.V. Dados espectrais fungo 2- <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida HMK R162;	133
Tabela 28 – A.V. Dados espectrais fungo 2- <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida Algochene pronto ws;	131
Tabela 29 – A.V. Dados espectrais fungo 2- <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida Cloreto benzalcônico;	132
Tabela 30 – A.V. Quadro com as médias dos 8 pontos selecionados nas placas de Petri com o fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> ;	133
Tabela 31 – A.V. Correlações efetuadas entre as placas de Petri com o fungo 2 ativo (vivo) e com as placas de Preti com o fungo 2 sujeito à atuação dos 3 biocidas: HMK R162, CB – Cloreto benzalcônico; Alg: Algochene Pronto ws	136
Tabela 32 – A.V.Dados espectrais fungo 3 <i>Cladosporium Sp.</i> , sem aplicação de biocidas; .	137
Tabela 33 – A.V.Dados espectrais fungo 3 <i>Cladosporium Sp</i> , com aplicação do biocida HMK R162K;	138
Tabela 34 – A.V.Dados espectrais fungo 3 <i>Cladosporium Sp</i> , com aplicação do biocida Algochene pronto ws;	138
Tabela 35 – A.V.Dados espectrais fungo 3 <i>Cladosporium Sp</i> , com aplicação do biocida Cloreto benzalcônico 50%;	138
Tabela 36 – A.V.Quadro com as médias dos 8 pontos selecionados nas placas de Petri com o fungo 3 - <i>Cladosporium Sp.</i> ;	141
Tabela 37 – A.V.Correlações efetuadas entre as placas de Petri com o fungo 3 ativo (vivo) e com as placas de Petri com o fungo 3 sujeito à atuação dos 3 biocidas: HMK R162, CB – Cloreto benzalcônico; Alg: Algochene Pronto ws	141
Tabela 38 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica sem aplicação de biocidas;	145
Tabela 39 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica com atuação do biocida HMK R162;	144
Tabela 40 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica com atuação do biocida Algochene pronto ws;	149
Tabela 41 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica com atuação do biocida Cloreto benzalcônico;	151

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento

O património cultural edificado está sujeito a diversos fatores de alteração, tais como fatores físicos, químicos e biológicos que, em conjunto, afetam a sua durabilidade.

A biodeterioração dos materiais utilizados nos edifícios é devida a processos biogeoquímicos e biogeo físicos que atuam sinergicamente (Caneva et al.,1991; Fonseca,2009). Os processos biogeoquímicos envolvem a alteração das propriedades intrínsecas do substrato, através da ação química dos microrganismos. Esta alteração pode dever-se à utilização deste como fonte nutricional pelos microrganismos ou ainda dever-se à excreção de produtos metabólicos destas e que possibilitam a modificação química dos substratos (Caneva et al.,1991; Gaylarde et al.,2003; Fonseca, 2009). Um dos fatores que potencia a deterioração biogeo física dos materiais é a formação de biofilmes (ou filmes biogénicos) no interior dos poros do substrato.

Esses biofilmes são capazes de induzir *stress* mecânico e consequentemente deteriorar o substrato por consequência da correlação entre a quantidade de água existente e o seu volume (Saiz-jimenez et al.,1999; Crispim et el.,2003; Fonseca, 2009).

Assim sendo, é necessária uma escolha adequada do protocolo de tratamento uma vez que quanto mais adequado são os produtos e métodos utilizados maior será a eficácia deste tratamento.

De entre todos os métodos de intervenção (mecânicos, físicos, biológicos, bioquímicos e químicos), a utilização de métodos químicos, como a aplicação de biocidas, tem sido dos métodos mais usados em tratamentos de conservação, nomeadamente de edifícios históricos e monumentos (Tiano et al.,1998). Os biocidas são produtos químicos que inibem e/ou destroem a actividade metabólica dos microrganismos, interferindo com as suas funções vitais, como por exemplo a fotossíntese ou a respiração (Bartolini et al.,2004; Caneva et al.,1996). No entanto, a escolha do biocida ideal é uma tarefa difícil, requerendo uma profunda análise do biocida, considerando a sua natureza química (orgânica ou inorgânica), o tipo de microrganismos a eliminar (algicida, fungicida, bactericida), o seu mecanismo de acção e tipo de formulação (pó, liquido, gás) (Fonseca, 2009). O conhecimento da natureza química do biocida a aplicar é extremamente importante, sobretudo devido às interferências que o produto biocida possa ter com o substrato, uma vez que mal selecionados, os biocidas poderão induzir reacções químicas indesejáveis no substrato (Fonseca, 2009).

1.2. Objetivos

O desenvolvimento de métodos eficazes para o controlo da biodeterioração do património cultural é uma área que tem sido estudada, e tem vindo a ser cada vez mais investigada. Esta dissertação tem como objetivo principal a avaliação e comparação da eficácia de tratamentos químicos, mais concretamente biocidas, de modo a determinar a melhor forma de prevenir a biodeterioração dos materiais de construção, e avaliação da aplicabilidade da análise multiespectral para avaliação da eficiência da actuação de biocidas.

A metodologia adotada para atingir este objetivo é o seguinte:

- a) Identificação da colonização biológica presente nos edifícios em estudo através de uma observação macroscópica e recolha de amostra para uma observação microscópica.
- b) Seleção dos produtos biocidas a aplicar: Cloreto de benzalcónico 50%, Algochene pronto WS e HMK R162.
- c) Avaliação dos tratamentos biocidas em laboratório através da medição de halos de inibição.
- d) Avaliação dos tratamentos *in situ*, aplicando os produtos em solução, em uma zona estratégica em cada edifício em estudo.
- e) Avaliação e comparação dos produtos biocidas aplicados, relativamente à sua eficácia e duração dos resultados atingidos.
- f) Avaliação da aplicabilidade da análise multiespectral para avaliação da eficiência de atuação de biocidas

1.3. Estrutura e organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em 8 capítulos, nomeadamente: introdução, biodeterioração de edifícios antigos, uso de biocidas, tratamento com biocidas, caso de estudo, trabalho de campo, análise multiespectral e por fim conclusão. O capítulo 1 introduz um enquadramento ao tema da dissertação, encontrando-se neste os objetivos a

alcançar, a metodologia de investigação a desenvolver e o modo como a dissertação se encontra estruturada e organizada. Os capítulos 2, 3 e 4 baseiam-se numa pesquisa bibliográfica em que os biocidas são o tema principal.

O capítulo 2 desenvolve o tema sobre a biodeterioração de monumentos e edifícios históricos, esculturas em pedra e qualquer artefacto pétreo causada por microrganismos.

O capítulo 3 são apresentadas informações sobre a definição biocidas, as considerações a ter na seleção de um biocida, fatores que interferem com a sua eficácia, a aplicação do mesmo, e por último as considerações ambientais durante o seu uso.

O capítulo 4 baseia-se em informação de estudos sobre tratamentos com biocidas em pedra, argamassa e azulejo.

O capítulo 5 descreve o local, mais concretamente os Edifícios da Mata Nacional do Buçaco, onde irá se desenvolver a avaliação da atuação dos biocidas. É feito o enquadramento geográfico e descrito a bioclimatologia da Mata do Buçaco, e por fim, são apontadas algumas técnicas de construção utilizadas nos edifícios em questão.

O capítulo 6 trata do trabalho de campo, ou seja, é feito a identificação do tipo de colonização biológica presente nos objetos de estudo, recolha de amostras, e é realizado o isolamento e meios de cultura. Os biocidas selecionados para o estudo são apresentados, e testados em laboratório e *in situ*.

O capítulo 7 trata do tema análise multiespectral, onde é feito o enquadramento do tema e é apresentada uma pesquisa bibliográfica sobre os sistemas multiespectrais. O equipamento espectral utilizado é discriminado, e apresentadas as metodologias laboratoriais realizadas das quais resultariam objetos (placas de Petri com 3 fungos isolados obtidos das amostras retiradas de um dos pilares exteriores do Hotel palácio, e amostras de rocha dolomítica colonizada com um dos fungos mencionados anteriormente) que foram sujeitos a leituras espectrais. Os resultados obtidos das leituras espectrais e a devida interpretação estão expostos no presente capítulo.

Por fim o capítulo 8, inclui a conclusão do trabalho desenvolvido.

Capítulo 2

Biodeterioração de Edifícios Antigos

2. BIODETERIORAÇÃO DE EDIFÍCIOS ANTIGOS

Como abordado anteriormente, a biodeterioração de monumentos e edifícios históricos, esculturas em pedra e qualquer artefacto pétreo causada por microrganismos é uma das grandes preocupações dos conservadores e um dos problemas mais complexos da área da conservação e restauro em todo o mundo. Esta complexidade advém não só do facto de os fatores ambientais externos (e.g. intensidade luminosa, humidade relativa, temperatura, contaminação atmosférica) não poderem ser controlados pelo conservador/gestor, mas também de as inter-relações entre os diferentes fatores ambientais e os microrganismos serem bastante complexas (A. Miller e M.F. Macedo,2000).

O estudo da alteração e alterabilidade das rochas aplicadas em património cultural construído, nestes últimos anos, tem recebido particular atenção por parte da comunidade científica devido à acelerada taxa de decaimento que se tem vindo a verificar e cujos fatores têm sido, desde há muito, alvo de atenção. (A. Miller e M.F. Macedo,2000).

A experiência existente e os trabalhos publicados neste domínio em Portugal, são escassos, demonstrando a necessidade de incrementar o conhecimento nacional nesta área. O conhecimento científico a nível nacional não muito elevado, aliado à inexistência de mão-de-obra e empresas qualificadas para levar a cabo este tipo de intervenções, dificultam a evolução do estudo neste sentido. Desde 2002, que o laboratório de investigação dedicado à área da pedra e biodeterioração, no Departamento de Conservação e Restauro da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, tem vindo a desenvolver alguns estudos referentes ao desenvolvimento e colonização de materiais pétreos por microalgas, cianobactérias e fungos (A. Miller e M.F. Macedo,2000).

2.1 O crescimento biológico sobre a pedra de construção

A sujidade superficial, biológica ou não-biológica para além de ser uma potencial causa de degradação a longo prazo, pode ser esteticamente desfiguradora da pedra. A desfiguração dos edifícios e dos monumentos pelos crescimentos biológicos, especialmente nos edifícios recentemente limpos, é causa de grande consternação. Considera-se que os crescimentos biológicos são um dos principais fatores envolvidos na conspurcação das fachadas dos edifícios (Grant, 1982; Seaward, 1979). Os crescimentos biológicos, tais como as algas, as bactérias, os fungos, os líquenes e os musgos, são muito vulgares no exterior dos

edifícios, especialmente nas zonas rurais. Eles vão colonizar a alvenaria sempre que existam as adequadas condições de humidade, luz, temperatura e nutrição. Apesar de os microrganismos poderem provocar danos à pedra de construção, os crescimentos podem ser não destrutivos e podem mesmo, como por exemplo os líquenes, ser frequentemente considerados como desejáveis, já que podem dar um aspeto de maturidade a uma fachada. No passado, eram frequentemente encorajados os crescimentos sobre as fachadas por meio de alguns métodos, incluindo a aplicação de uma aguada de excrementos de vaca, de urina ou de leite desnatado (BRS, 1972; BRE, 1992; Richardson, 1973).

2.2 O crescimentos biológico como causa de degradação da pedra

Os crescimentos biológicos são capazes de provocar o desfiguramento e de danificar a pedra de construção, pelo que, em certos casos, a sua presença pode ser considerada indesejável, especialmente quando a pedra estiver exposta à água da chuva ou a condições de elevada humidade, uma vez que os crescimentos biológicos são mais ativos sob essas condições. Muitos organismos segregam ácidos e outras substâncias em resultado dos seus processos metabólicos, as quais podem afetar os minerais constituintes das rochas e podem ser destrutivos para a pedra (Jones e Wilson, 1985; Krumbein, 1988; Lewis *et al.*, 1985; Ortega-Calvo *et al.*, 1993; Sand e Bock, 1991). Os crescimentos podem obscurecer e provocar a degradação das inscrições (Wainwright, 1986) e das esculturas, e alguns podem manchar as paredes (Wee and Lee, 1980). Os crescimentos biológicos podem reter a poeira e os poluentes, provocando a aceleração de sujidade na superfície de um edifício e ajudando ao estabelecimento de plantas maiores que aumentam a retenção da água e que podem provocar o entupimento de caleiras e tubos de queda de águas pluviais (BRE, 1992; Grant, 1982; Grant & Bravery, 1985; Richardson, 1973). Ao longo do tempo, as alterações de cor na superfície das pedras têm sido atribuídas a causas biológicas, por alguns autores (Knight, 1777 and Liebig, 1853 in Krumbein, 1993)

2.3 O estabelecimento de microorganismos sobre a pedra

Os microorganismos encontrados sobre a pedra podem ter sido aí depositados por esporos ou rebentos existentes na atmosfera, ou por contacto direto com organismos no solo. As condições necessárias para a colonização de um substrato variam conforme o tipo e a espécie de organismo. Os microorganismos fotossintéticos, que usam a luz para fixarem o carbono do CO₂ atmosférico, podem sobreviver com humidade, sais minerais e luz. Outros

organismos exigem a humidade e os nutrientes, mas não a luz. Muitos microorganismos podem suportar a secura durante períodos relativamente longos, mas o seu crescimento ativo exige, habitualmente, elevados níveis de humidade. Nas zonas urbanas, a diversidade e a abundância de muitos crescimentos biológicos tem sido fortemente reduzida pela poluição atmosférica. Isto pode resultar no domínio de uma fachada por uma espécie tolerante à poluição, dando-lhe uma aparência desagradável e monótona, em vez do mosaico de espécies que ainda podem ser encontradas nas zonas rurais. É possível que, se os níveis de poluição do ar diminuírem no futuro, uma fauna mais variada possa regressar à paisagem urbana.

Capítulo 3

O Uso de Biocidas

3. O USO DE BIOCIDAS

Biocida representa toda e qualquer substância que "mata a vida", concluindo isto através da simples decomposição da palavra biocida, "*bio*" significa vida e "*cida*" significa matar. Pode também ser descrito como sendo uma substância antimicrobiana que contém um ou mais ingredientes ativos capazes de prevenir, inibir, diminuir ou eliminar a ação de organismos vivos, patogênicos e não patogênicos (Block, 1991; Cloete *et al.*, 1994; Paulus, 1996; Pereira, 2001). Entende-se por *Produtos Biocidas* "Substâncias ativas e preparações que contenham uma ou mais substâncias ativas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador, e que se destinem a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a ação de um organismo prejudicial por mecanismos químicos ou biológicos"(Pereira, 2001).

Este produto químico é muitas vezes apelidado de desinfetante, preservante, antisséptico, "higienizante", entre outros termos menos comuns. Geralmente, a área de aplicação (área médica, alimentar, doméstica, água potável, indústria, etc.), é que determina o termo a ser utilizado (Cloete *et al.*, 1994) existindo algumas diferenças ao nível da sua natureza química e do seu mecanismo de ação. Uma vez que os biocidas são utilizados contra a colonização biológica, e esta é produzida com maior predominância por bactérias, os biocidas podem também ser denominados por bactericidas. A atuação dos biocidas é através do seu ataque aos componentes celulares funcionais, colocando os microrganismos em *stresse*, sendo os seus alvos preferenciais essencialmente a parede celular, os componentes da membrana citoplasmática e o citoplasma (Cloete *et al.*, 1998; Denyer e Stewart, 1998; Shepherd *et al.*, 1998; Al-Adham *et al.*, 1998; Pereira, 2001). O acesso a estes alvos é determinado pela composição química e propriedades físico-químicas que cada biocida (Paulus, 1993), bem como pelas possíveis interações com material extracelular, pela composição química celular e pela morfologia das células (Denyer e Stewart, 1998; Pereira, 2001).

Assim, os biocidas têm que ser capazes de atravessar a membrana exterior das células microbianas por forma a atingir os locais alvo com uma concentração mínima ativa. (Pereira, 2001)

3.1. A Classificação de Biocidas

Os biocidas podem ser classificados relativamente ao seu mecanismo de ação como electrofílicamente ativos, ativos ao nível da membrana ou compostos quelantes (Paulus et el.,2005; Fonseca, 2009).

Os biocidas classificados como electrofílicamente ativos representam a maior parte dos biocidas atualmente usados, onde se inclui os aldeídos e os compostos organometálicos (Fonseca, 2009). O efeito anti-microbiano destes produtos advém do facto de estes compostos procurarem substratos que contenham uma elevada densidade eletrónica, como os componentes nucleofílicos da célula microbiana (Paulus et el.,2005; Fonseca, 2009).

Relativamente aos biocidas ativos ao nível da membrana ou compostos quelantes este grupo inclui os álcoois, fenóis, ácidos salicilanilidas, dibenzamidas, sais de amónio, entre outros (Fonseca, 2009). O mecanismo de ação inicial destes compostos passa pela adsorção à parede celular dos microrganismos, induzindo alterações na membrana exterior e parede celular, resultando na perda de integridade e permitindo biocidas cheguem à membrana citoplasmática, onde atuam de forma letal (Paulus et el.,2005; Fonseca, 2009).

A organização dos biocidas pode também ser efetuada de acordo com o seu carácter químico, em dois grupos: os biocidas oxidantes e os não oxidantes.

O mecanismo de ação dos biocidas oxidantes assenta na oxidação de compostos constituintes dos microrganismos, sendo consequentemente efetivos contra todos os tipos de microrganismos (isto é, bactérias, fungos, algas e leveduras) (Pereira, 2001).

Já a atuação dos biocidas não oxidantes, englobam uma enorme variedade de compostos orgânicos, exercem a sua atividade antimicrobiana atuando sobre os microrganismos por interferência com o seu metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular. Contrariamente aos biocidas oxidantes, os microrganismos podem adaptar-se aos biocidas não oxidantes, principalmente se estes forem aplicados em concentrações abaixo da concentração mínima requerida e por longos períodos de tempo (Pereira, 2001).

3.2. Considerações a ter na seleção de um biocida

A escolha do biocida mais apropriado deve ter sempre por base, estudos laboratoriais prévios que constituirão a primeira etapa do processo (Rossmore, 1995), que devem ter sempre em consideração os seguintes parâmetros (Bott, 1992; Gaylarde e Videla, 1994; Flemming e Schaule, 1996; Gaylarde e Morton, 1999; Pereira, 2001):

- O biocida deve apresentar uma grande toxicidade para os microrganismos alvo, a baixas concentrações, toxicidade baixa para as restantes formas de vida, e ser ativo contra uma vasta gama de microrganismos;
- Não apresentar corrosividade para os materiais e equipamentos;
- A eficiência do biocida não deve ser prejudicada pela presença de materiais orgânicos e/ou inorgânicos;
- Deve existir compatibilidade com outros aditivos (inibidores de corrosão, por exemplo);
- Custo do biocida bem como os custos associados à sua aplicação;
- Segurança do ponto de vista da saúde, manuseamento e armazenamento;
- Apresentar estabilidade sobretudo no que respeita a alterações de pH e temperatura;
- Limitações e restrições ambientais, impacto ambiental, efeitos toxicológicos;
- Ser biodegradável;

O cumprimento de todas estas exigências por parte de um biocida é difícil, pelo que a escolha final de um biocida em detrimento de outro será sempre uma solução de compromisso para uma determinada situação (Pereira, 2001). Deverá também considerar-se o tipo e a concentração dos microrganismos a serem tratados (Cloete *et al.*, 1994; Lutey, 1995; Pereira, 2001).

A aplicação de biocidas e sua seleção tem vindo a tornar-se mais restritiva devido, essencialmente, a dois fatores, à toxicidade do produto e o eventual impacto na saúde e no ambiente.

3.3. Fatores que interferem com a eficácia de um biocida

Existem vários fatores intrínsecos e ambientais que afetam a eficiência de um biocida, entre os quais se destacam (Lutey, 1995; Pereira, 2001):

- A possível interferência com outras substâncias (cálcio, ferro, amônio, etc.).
- A temperatura, porque biocidas são sensíveis à temperatura, podendo mesmo estar relacionado com a sua decomposição.
- Parâmetros como a concentração efetiva e o tempo de contacto do biocida;
- O pH, os biocidas podem tornar-se instáveis devido a alterações do pH, enquanto outros têm valores ótimos de pH de funcionamento;
- O tipo de microrganismos presentes, o seu estado fisiológico, idade e qualidade das comunidades biológicas (denso e compacto ou aberto e pouco coeso);
- A presença de matéria orgânica (que não os microrganismos) e/ou inorgânica pois podem reagir com o biocida, tornando-o assim menos disponível para eliminar os microrganismos;

Assim podemos concluir, que devemos procurar investigar no sentido de se melhorar a atividade do biocida, ou seja, alargar o seu espectro de destruição, aumentando a sua velocidade de ação e reduzindo a sua concentração efetiva, e simultaneamente respeitar as normas de proteção do ambiente e da saúde humana.

3.4. A aplicação de biocidas

A aplicação do biocida é um parâmetro muito importante, tanto ou quanto a sua seleção, pois a sua aplicação pode não reduzir o sujidade biológico se não for utilizado na dose certa e na frequência correta (Heinzel, 1998; Gaylarde e Morton, 1999).

O conhecimento da natureza química do biocida a aplicar é extremamente importante, sobretudo devido às interferências que o produto biocida possa ter com o substrato. Quando mal selecionados, os biocidas poderão induzir reações químicas indesejáveis no substrato e alterações cromáticas, como amarelecimento ou branqueamento, modificações no brilho ou na diafaneidade da superfície (Caneva et al., 1996; Fonseca, 2009). Contudo, o grau de interferência do produto com o substrato relaciona-se também com a sua forma de aplicação (Fonseca, 2009).

Os produtos podem ser aplicados por diferentes métodos: *spray*, pincel/escovas, injeção, fumigação, pó ou granulado. A escolha do método de aplicação depende da concentração que se queira aplicar, do tempo de contato, da natureza química do produto, das condições atmosféricas no momento de aplicação e, por último, mas não menos importante, das propriedades químicas e físicas do substrato e das condições de conservação do mesmo. A aplicação de soluções diluídas de biocidas através de pincel ou *spray* é a forma mais comum de aplicação em património cultural edificado (Caneva et al.,1991; Tiano P et al.,1998; Fonseca, 2009).

Antes de qualquer aplicação de um produto químico, é necessário garantir a compatibilidade química e física entre o biocida e o substrato. Se não existir nenhuma informação relativa ao produto, é fundamental recorrer inicialmente a testes laboratoriais, utilizando provetes do mesmo tipo de substrato, simulando as mesmas condições a que o material se encontra sujeito (Caneva et al.,1991; Fonseca, 2009). A análise da natureza química do produto biocida facilitará o cumprimento dos principais requisitos a ter em conta: a eficácia do produto na eliminação dos microrganismos, a interferência com o substrato, os riscos para o meio ambiente e saúde pública (toxicidade) e os efeitos a longo prazo (Nugari et el.,2003; Fonseca, 2009). A eficiência do biocida é definida tendo em conta três parâmetros: a dose do produto (quantidade de produto por área de aplicação), o espectro de ação e a persistência do produto. O biocida ideal deverá atuar com eficácia no momento desejado e ser o menos tóxico possível. Um produto de longa persistência, aplicado em alta concentração, será mais eficaz contra os microrganismos a eliminar, mas pode causar sérios danos ao meio ambiente e à saúde pública (Fonseca, 2009).

Os intervalos de tempo entre as aplicações de biocida são determinados pelo biocida em questão e pela gravidade do problema. A duração do período de tratamento deve providenciar tempos de contacto adequados entre os microrganismos e o biocida à concentração mínima necessária (Pereira, 2001)

De acordo com o relato de Pujo e Bott (1992) um biocida mostra-se pouco eficaz no tratamento de comunidades biológicas bem estabelecidos, quando aplicado de forma contínua e a baixas concentrações (20 mg L⁻¹ a 40 mg L⁻¹). Contudo, as mesmas concentrações de biocida foram suficientes para prevenir o desenvolvimento dessas mesmas comunidades quando foram aplicadas numa fase mais precoce do seu desenvolvimento (Pereira, 2001).

3.5. Considerações Ambientais

A aplicação de biocidas pode ter um julgamento depreciativo. Por um lado, porque estes produtos não promovem uma proteção a longo prazo contra a biodeterioração, muitas vezes devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos, tendo que ser novamente reaplicados (Russel et al., 1990, Fonseca, 2009). Por outro lado, porque muitos destes produtos podem induzir problemas ambientais e de saúde pública, devido à toxicidade e sobredosagem (Tiano P et al., 1998; Fonseca, 2009).

Os agentes antimicrobianos, geralmente são produtos químicos de elevada toxicidade química. Assim podemos concluir que o uso de biocidas de carácter químico persistente, do ponto de vista ambiental, é inaceitável em face dos potenciais riscos ambientais que poderão surgir, uma vez que, potencialmente, os biocidas acabam por ser lançados no ambiente (Pereira, 2001).

Um agente antimicrobiano só deve afetar os microrganismos ou comunidades de microrganismos para os quais foi selecionado e em concentrações suficientes e necessárias para a sua eliminação. Mas o que se vem a constatar é que, quase todos os produtos químicos deste tipo são aplicados em concentrações excessivas, assim podem perturbar outras formas de vida quer animal quer vegetal. Concluindo que se a opção for por continuar a implementar estratégias de combate a comunidades biológicas através do uso de agentes antimicrobianos, para além da eficiência dos agentes químicos, a resistência que a presença biológica apresenta à sua ação, a sua biodegradabilidade e impacto ambiental terão também que ser considerados aquando das tomadas de decisão (Cloete et al. 1998; Pereira, 2001).

Um biocida deve apresentar propriedades não persistentes e não bioacumulativas e deve ser rápida e facilmente decomposto em espécies químicas com níveis baixos de toxicidade para todas as formas de vida (Weiler et al., 1993; Pereira, 2001). Um exemplo flagrante do impacto dos biocidas na saúde humana e no ambiente é dado pelo biocida que tem como composto ativo o cloro que foi usado durante muitos anos em circuitos de água de sistemas industriais. Estes biocidas foram os mais usados devido à sua elevada eficiência, facilidade de aplicação e relativamente baixo custo. Contudo, os subprodutos resultantes da reação do cloro com matéria orgânica presente nos sistemas de água

(clorofórmio e outros trihalometanos) (Chen et al., 1993; Cloete et al., 1998) representam poluentes tóxicos e carcinogénicos que são persistentes no ambiente, podendo até entrar nas cadeias alimentares (Pereira, 2001).

Face à importância da conservação do património cultural, surge a necessidade de uma política de sustentabilidade do património que seja auto-sustentável e compatível com o meio ambiente.

Capítulo 4

Tratamento com Biocidas

4. TRATAMENTO COM BIOCIDAS

De seguida irá ser abordado estudos, que têm como ponto fulcral avaliar a eficácia de vários biocidas comerciais na atuação contra a colonização biológica nos edifícios pétreos ou revestidos com argamassa ou fachadas azulejadas. Sendo a pedra a área da de intervenção, vai ser abordada a eficácia de Biotin T, Cloreto Benzalcónico (BAC) e Dyrup. Na área de intervenção a argamassa, vai ser abordado novamente o Biocida Biotin T, o biocida Anios D.D.S.H, e um químico alternativo aos biocidas, o TiO_2 . Por fim em relação aos azulejos como área de intervenção, os biocidas Preventol, Albilex, e novamente o Biotin T e TiO_2 vão ser analisados.

4.1. Área de Intervenção: Pedra

A investigação levada a cabo por Dina M.R.Mateus et al.,2013, foi feita sobre o Convento de Cristo, um complexo monumental histórico localizado na cidade de Tomar, em Portugal. Considerado Património da Humanidade pela UNESCO desde 1983. Foram recolhidas amostras de seis locais da abside da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, que se encontra voltada a Norte (Fig.1 e .2). As amostras foram recolhidas do lado direito (Oeste) e do lado esquerdo (Este) da abside da Sacristia. A escolha dos locais de recolha das amostras permitiu-lhes avaliar a diferença de colonização biológica com a diferente exposição aos elementos atmosféricos. O método usado foi o *swabbing*, com zaragatoas esterilizadas e mergulhadas em solução de Ringer para transporte. Os investigadores optaram pelo método de *swabbing* com zaragatoa por ser um método não invasivo da matriz de suporte e permitir grande versatilidade de escolha da zona de amostragem.



Figura 1. Locais de recolha de amostras (Dina M.R. Mateus et al.,2003)

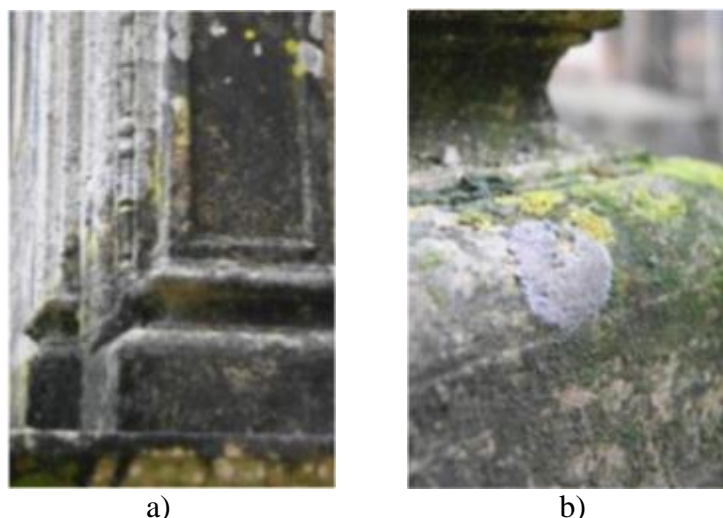


Figura 2. Locais de recolha de amostras: A) Base da coluna esquerda b) Base da coluna direita (Dina M.R. Mateus et al., 2013).

4.1.1. Biocidas selecionados

Após o isolamento dos microrganismos e da sua caracterização inicial, os isolados foram utilizados para testar alguns biocidas comerciais, por forma a se avaliar a sua eficácia. Foram selecionados dois agentes que já estavam a ser usados no monumento e normalmente utilizados em trabalhos de conservação e restauro, sendo lhes apontadas as vantagens de apresentarem elevada eficiência e uma interferência mínima com o substrato pétreo. Utilizou-se ainda um terceiro biocida, com um princípio ativo diferente, normalmente não utilizado em substrato pétreo, mas como aditivo em tintas e vernizes m tintas e vernizes comerciais aplicados em trabalhos de construção e de reabilitação urbana (Tabela 3).

Biocida (nome Comercial)	Ação	Princípio ativo
Biotin T	Largo espectro	Cloreto de didecil dimetilamónio (sal de amónio quaternário); 2-octil-2H-isotiazol-3-ona (isotiazolinona); Ácido fórmico ;
Cloreto Benzalcónico	Largo espectro	Cloreto de alquil dimetil benzil amónio (sal de amónio quaternário)
Aditivo anti-algas e fungos, Dyrup	Fungicida e algicida	N-2-terbutil-N-4-etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2-4-diamina (triazina)

Tabela 1. Principais características dos biocidas (Dina M.R.Mateus et al.,2013)

4.1.2. Método de Aplicação

Para a avaliação da eficácia dos diferentes biocidas, utilizaram-se pequenos discos de papel absorvente, embebidos no biocida a testar (soluções aquosas 3 % v/v). Colocaram-se os discos sobre placas inoculadas (Fig.3a), por espalhamento, com os microrganismos a testar. Os ensaios foram realizados em duplicado. Fez-se a observação do crescimento após 96 horas, confirmando a presença de halos de inibição de crescimento microbiano em torno dos discos embebidos em biocida. Estes halos de inibição foram medidos e comparados, sendo tomados como indicadores da suscetibilidade do microrganismo ao biocida em causa. Quanto maior o halo, mais eficaz será o biocida. (Fig.3b)

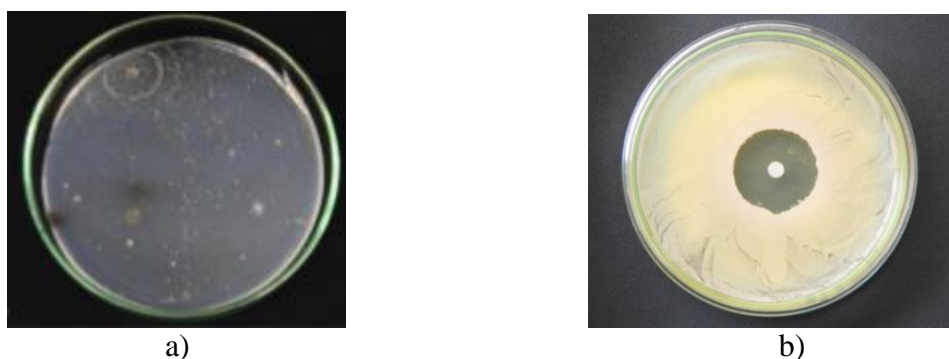


Figura 3. a) Placas cultivadas com microrganismos b) Exemplo ilustrativo de um *halo* de inibição de crescimento provocado por um disco embebido em biocida (Dina M.R.Mateus et al.,2013)

4.1.3. Resultados de eficácia

Conclui-se que, para os isolados bacterianos, o Biotin T provou-se menos eficiente, tanto em termos médios, como para a maioria dos microrganismos isolados considerados separadamente. Para os isolados fúngicos o Biotin T foi o mais eficaz, apresentando, não apenas o valor médio de halo de inibição mais elevado como também os maiores halos de inibição para praticamente qualquer um dos isolados. Este resultado é congruente com o esperado, dada a atual tendência para substituir o cloreto de benzalcónio pelo Biotin T.

A comparação entre o aditivo para tintas e o cloreto de benzalcónio não é tão clara. Em termos médios, o aditivo para tintas teve um efeito ligeiramente superior, mas em alguns isolados o cloreto de benzalcónio apresentou resultados claramente superiores. O aditivo para tintas é fungicida e algicida, mas será, provavelmente, muito menos eficaz contra bactérias, o que poderá ditar o seu abandono caso a contaminação bacteriana seja elevada. Os resultados obtidos reforçam a ideia de que, antes de se intervir num suporte com colonização biológica,

se deve proceder à identificação das espécies presentes, bem como à sua suscetibilidade aos diferentes agentes biocidas. Obviamente, para além da eficácia direta, é necessário ter em conta o espectro de ação. A escolha dos biocidas parece atualmente ser ditada pela preocupação em controlar os agentes fúngicos e algas; no entanto deverá ter-se em atenção que as bactérias poderão também desempenhar um papel ativo na deterioração da pedra.

4.2. Área de Intervenção: Argamassa

De seguida vai ser abordada a dissertação de mestrado de Ana Josina Fonseca (2009), em que um dos objetivos foi a comparação da eficácia de dois biocidas e um produto químico alternativo aos biocidas, em que a área de intervenção destes três químicos é argamassa. A metodologia do estudo foi a seguinte:

- a) Seleção de dois biocidas, Anios D.D.S.H e Biotin T, e um fotocatalisador, o dióxido de titânio (TiO₂).
- b) Avaliação da atuação dos três tratamentos em argamassas, quer em laboratório, através da inoculação de provetes com microrganismos fotossintéticos, quer *in situ*, aplicando os tratamentos, em solução, em duas paredes do Palácio Nacional da Pena.
- c) Avaliação e comparação da ação dos tratamentos através de diversas técnicas analíticas como a quantificação da clorofila a, através do método espectrofluorimétrico e através do método de extração, e medições colorimétricas.
- d) Seleção do tratamento mais eficaz na prevenção da biodeterioração de argamassas

4.2.1. Biocidas selecionados

Os químicos usados para o estudo da dissertação de Ana Josina Fonseca foram, um biocida convencional, o Biotin T®, frequentemente utilizado em operações de limpeza do património cultural edificado, e um biocida usado em âmbito hospitalar como produto desinfetante de superfícies hospitalares: o Anios DDSH®. Por último, como produto alternativo aos biocidas, selecionou-se o TiO₂ (P-25 da Degussa Corporation), proporção anatase: rútilo = 4:1 e com uma área superficial específica de 50 m²/g, correspondendo a um tamanho médio de partícula de cerca de 21 nm.

Nome Comercial	Tipo de Produto	Princípio Ativo	Modo de atuação
Biotin T	Biocida orgânico de largo espectro	n-ottil-isotiazol+sal de amónia quartenária+ácido fórmico	Afeta a membrana citoplasmática dos microrganismos
Anios D.D.S.H	Desinfetante orgânico de âmbito hospitalar	Sal de amónia quartenária+ guanidino acetano+n-propanol	Afeta a membrana citoplasmática dos microrganismos
TiO₂(P25 Degussa)	Semicondutor Inorgânico	99,50% TiO ₂ 80% de Anatase	Formação de radicais OH reativos que degradam a matéria orgânica

Tabela 2. Principais características dos biocidas (Fonseca, 2009).

Os biocidas comerciais de largo espectro mais utilizados em tratamentos de conservação em património cultural edificado, são os compostos de amónia quaternária (QACs) (Caneva et al.,1991, Gaylarde et al.,2003,20-22). Estes QACs são agentes surfactantes catiónicos que exibem elevada atividade e estabilidade a longo prazo, mesmo quando aplicados em baixas concentrações. Estes produtos exibem baixa interferência com os minerais dos substratos (Bartolini et al.,2004,519-526). Os QAC`s são biocidas de largo espectro: algicidas, bactericidas e fungicidas. Os biocidas de superfície ativa catiónica são classificados, segundo o mecanismo de ação, como ativos ao nível da membrana. Estes compostos são atraídos pela superfície carregada negativamente da célula do microrganismo.

A parede celular vai perdendo a sua função protetora e os agentes ativos do biocida chegam à membrana citoplasmática, destruindo a sua integridade estrutural (Fonseca, 2009). O TiO₂ é um dos fotocatalisadores mais eficientes usados em processos de limpeza ambiental, para a degradação de poluentes orgânicos e compostos aromáticos, na conversão e armazenamento de energia solar e também na área da medicina (Beydoun et al.,1999,Sunada et al.,2003, Fonseca, 2009).

O TiO₂ existe na natureza sob três formas cristalinas: anatase, rútilo e brookite, sendo o rútilo a forma mais frequente. Apesar de esta forma ser a mais abundante, a anatase é a forma que possui o potencial fotoactivo mais elevado de todas as fases cristalinas do TiO₂ (K.QI et al2007, Chen et al.,2009). Nesta investigação estudou se o processo fotocatalítico do TiO₂ sob a ação da luz solar, de forma a reproduzir as condições naturais a que os monumentos se encontram normalmente sujeitos. A suspensão ou imobilização do TiO₂ em materiais de construção, possibilita constituir por si só um sistema de auto-limpeza, que funcionará ao nível da conservação preventiva, inibindo o crescimento de microrganismos. Para além da elevada atividade fotocatalítica, as propriedades super-hidrofílicas do TiO₂, que

facilitam a dispersão da água nas superfícies dos materiais, mantêm os materiais constantemente limpos, facilitando o processo de descontaminação microbiana.

4.2.2. Método de Aplicação

A avaliação do efeito biocida dos três produtos selecionados foi verificada de duas formas: testes em laboratório e testes *in situ* aplicados nas paredes exteriores do Palácio Nacional da Pena. Para a realização de testes em laboratório, foi usado provetes de argamassas (Argamassa bastarda de areia de corroios (AC) e Argamassa bastarda de areia de quartzo (AQz)), sendo o Biotin T aplicado por pincel e Anios D.D.S.H aplicado por spray. Em relação ao TiO_2 a aplicação foi feita por duas metodologias, sendo a primeira: mistura do TiO_2 juntamente com os restantes componentes das argamassas (TiO_2 misturado), e a segunda metodologia: imobilização do TiO_2 nas partículas de areia e foi apenas experimentada para a argamassa de areia de quartzo (TiO_2 imobilizado).

Para a realização dos testes aplicados em património cultural, seleccionaram-se duas zonas (paredes) do Palácio Nacional da Pena, em Sintra. A primeira zona seleccionada localiza-se no Pátio dos Arcos. É caracterizada como um reboco de tonalidade castanho-amarelada. Uma vez que se encontra numa zona de sombra pouco exposta à radiação solar direta, é bastante húmida, sendo colonizada sobretudo por líquenes de pequenas dimensões e bactérias (Fig. 4).

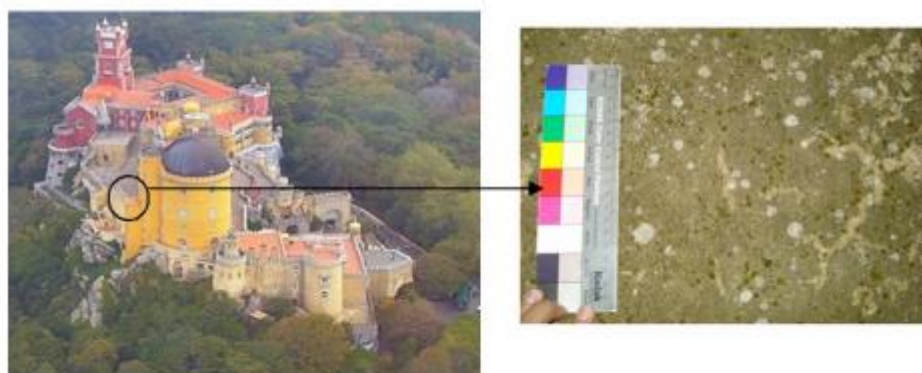


Figura 4. Localização da 1ª zona seleccionada, no Pátio dos Arcos, no Palácio Nacional da Pena (Fonseca, 2009)

A segunda zona localiza-se no Terraço D. Carlos. O reboco aqui encontrado é de tonalidade cor-de-rosa e, ao contrário do anterior, recebe radiação solar direta durante grande parte do dia (Fig. 5). Em ambas as paredes, foram aplicadas suspensões aquosas dos três

produtos em pequenas áreas (10x 15 cm). O Biotin T foi diluído a 2% e aplicado a pincel, já o biocida Anios DDSH foi aplicado diretamente por *spray*, sem nenhuma diluição adicional. Por último, o TiO_2 foi aplicado a 1%, por *spray*.

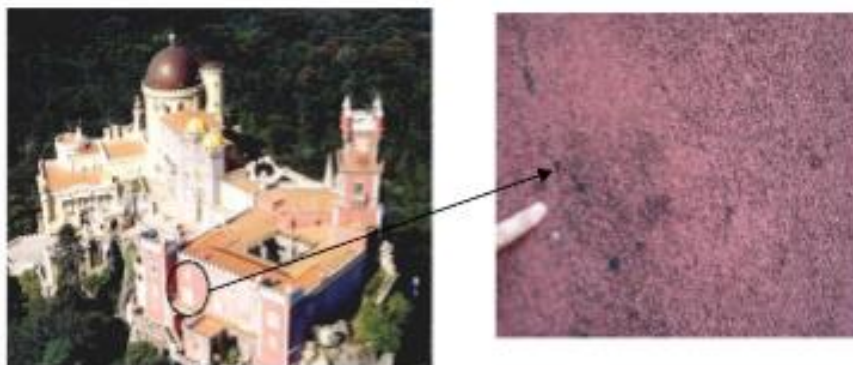


Figura 5. Localização da 2ª zona seleccionada no Terraço D. Carlos, no Palácio Nacional da Pena (Fonseca, 2009)

4.2.3. Resultados de eficácia

Após a avaliação dos resultados obtidos quer em laboratório, quer *in situ*, conclui-se que a aplicação do TiO_2 a materiais de construção constitui um tratamento eficaz na prevenção e/ou eliminação da biodeterioração. Em laboratório, a metodologia de aplicação do TiO_2 através da adição deste fotocatalisador aos restantes componentes de fabrico das argamassas (TiO_2 misturado), foi a metodologia mais eficaz na eliminação dos microrganismos presentes nos provetes. Através das técnicas de quantificação da clorofila a, verificou-se a eliminação das culturas inoculadas, comprovando a ação fotocatalítica deste composto. Relativamente aos produtos biocidas, quer nos testes laboratoriais, quer nos testes *in situ*, o produto Biotin T foi muito mais eficaz, na eliminação da colonização biológica presente, do que o produto Anios D.D.S.H (Fig.6 e 7). Conclui-se assim que o TiO_2 apresenta resultados mais satisfatórios na prevenção e/ou eliminação da biodeterioração dos materiais que os produtos biocidas testados. Os resultados obtidos apresentam uma abordagem inovadora para o controlo da biodeterioração em materiais de construção, na medida em que se pode agora começar a apostar em materiais inteligentes, autossustentáveis e compatíveis com o meio ambiente. Assim, a aplicação de fotocatalisadores em materiais de construção, poupará tempo e dinheiro gasto em operações de limpeza e manutenção dos revestimentos exteriores.







TiO ₂		
Biotin T		
Anios D.D.S.H		
	a)	b)

Figura 6. Pátio dos Arcos: a) Antes do tratamento b) após o tratamento







TiO ₂		
Biotin T		
Anios D.D.S.H		
	a)	b)

Figura 7. Terraço de D. Carlos: a) Antes do tratamento b)Após o tratamento

4.3. Área de Intervenção: Azulejos

Na tese de doutoramento de Mathilda Coutinho (2015), um dos objetivos era o estudo da eficácia de tratamentos biocidas contra colonização biológica em azulejos. Este estudo incidiu sobre os azulejos de cerâmica situados no jardim da Casa da Pesca, localizado em Oeiras, Portugal. Alguns desses painéis de azulejos exteriores são deterioradas pelo crescimento de biofilmes (também designados como depósitos biológicos ou películas microbianas) castanhos compostos por algas verdes, cianobactérias e fungos dematiáceos. Três biocidas comerciais (Biotin ® T, Preventol® RI 80 e Albilex Biostat®) e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) foram testados *in situ*. A eficácia dos mesmos foi monitorizada por exame visual, microscopia de epifluorescência e análise baseada em DNA, sendo só o exame visual relatado no presente relatório, por motivos de maior relevância.

4.3.1. Biocidas selecionados

As Potencialidades fotocatalíticas do TiO₂ já foram analisadas neste presente relatório como eficientes na degradação da matéria orgânica para o controlo da biodeterioração em revestimentos do património cultural, mas agora, analisado para aplicação em azulejos. Biotin, também já abordado neste relatório, é um biocida de amplo alcance comercial que foi testado com sucesso em termos de património cultural (De los Ríos et al., 2012). Este biocida tem compostos de amónio quaternário na sua composição que são aprovados para a conservação de monumentos do património cultural pela European Biocide Directive, que os considera amigos do ambiente (Cooke, 2002). Preventol é também um biocida comercial com base em amónio quaternário que tem sido usado no património cultural, incluindo monumentos de pedra e pinturas murais (por exemplo, Ascaso et al 2002; Nugari et al., 2009).

Por ultimo, Albilex, é um biocida comercial que tem sido usado com sucesso pelo Museu Nacional do Azulejo, em Lisboa, para inativar a colonização biológica de azulejos vidrados. Similar aos outros biocidas comerciais testados (compostos baseados QAC), o cloreto de alquil-benzil-dimetil amónio é o seu principal composto ativo. Além disso, contém di-hidróxido de crómio (H₂Cr₂O₇) como princípio ativo.

4.3.2. Método de Aplicação

Como foi dito anteriormente quatro diferentes tratamentos foram testados sobre os biofilmes presentes no azulejo:

- a) O dióxido de titânio anatase P25 nanocristalino (TiO_2) com a área de superfície específica de $50 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, com um tamanho de partícula de aproximadamente 20 nm (Degussa, Alemanha);
- b) Preventol® RI 80, composto por cloreto de alquil-benzil-dimetil-amónio e álcool isopropílico (Lanxess, Alemanha);
- c) Biotin®T, que contém cloreto de alquil-benzil-dimetil-amónio, octil-isotiazolona e 3-iodo-2propynyl-butilcarbamato (CTS, Espanha);
- d) Albilex Biostat®, contendo cloreto de alquil-benzil-dimetil-amónio e di-crómio ($\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (2: 1) (Albishausen & Co. KG, Alemanha);

O tratamento de TiO_2 usado neste estudo foi preparado através de uma suspensão aquosa a 1% (w / v), que foi previamente testada em património cultural exterior (Fonseca et al., 2010). Todos os biocidas comerciais foram aplicados utilizando as concentrações especificadas nas instruções do fabricante: 2% (v / v) para a biotin, 2% (v / v) para Preventol e 1% (v / v) para Albilex. Cada um destes quatro tratamentos foi aplicado diretamente em 3 azulejos com o auxílio de um pincel até cada um dos azulejos ficarem completamente cobertos com o biocida utilizado. Esta experiência *in situ* foi realizada no verão para garantir a chuva não iria ocorrer imediatamente após tratamentos.

4.3.3. Resultados de eficácia

As observações macroscópicas revelaram que os tratamentos aplicados induziram a alterações nos biofilmes ao longo do tempo, com a exceção do tratamento Albilex, onde não houve alterações evidentes (Fig.8). A aplicação do biocida fotocatalítico (TiO_2) resultou em uma camada de branco depositado sobre o biofilme devido às nanopartículas de TiO_2 , que têm cor branca. Estas partículas foram perdidas ao longo do tempo, talvez devido à lixiviação das partículas pela chuva (Fig.8). Embora a variação da cor do biofilme e a densidade não fosse evidente, observou-se uma diminuição na área de cobertura do biofilme (Fig. 8) que claramente perdeu a sua adesão ao substrato. O desprendimento do biofilme é visível seis meses após o tratamento, e é provável que tenha sido causada pelo efeito de auto-limpeza

induzida por as nanopartículas de TiO_2 . A aplicação de Biotin T provocou uma ligeira variação da cor do biofilme, mas o efeito mais notável foi a perda de densidade no final da experiência (Fig. 8). O biocida Preventol foi o que causou as mudanças mais significativas sobre o biofilme, alterando sua cor, densidade e espessura (Fig.8). Estes efeitos sobre o biofilme foram progressivos após o tratamento, mas tornou significativamente evidente após 4 meses da aplicação dos tratamentos com os biocidas (Fig. 8). Só os azulejos nos quais foram aplicados o tratamento com o Biotin T e Preventol é que a visualização da pintura do azulejo é melhor, no entanto, o biofilme degradado ainda estava presente nos azulejos.

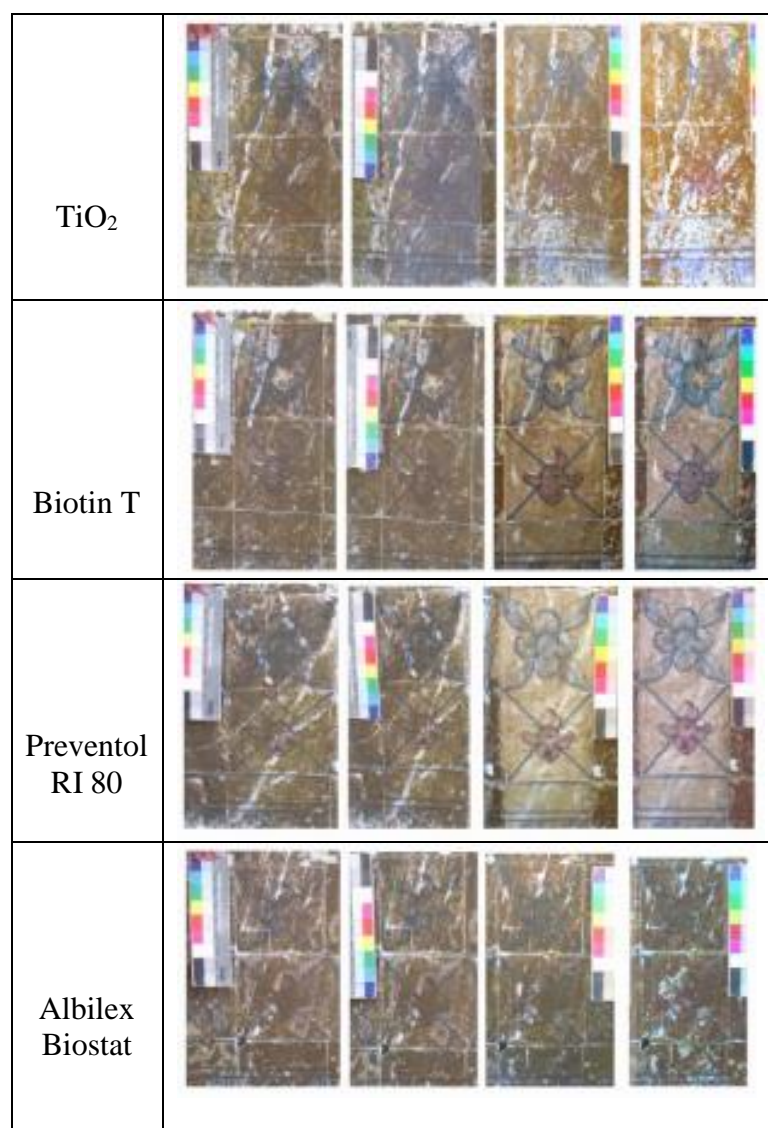


Figura 8. Registo fotográfico do efeito cada tratamento aplicado sobre os biofilmes acastanhadas em azulejos vidrados da Casa da Pesca após 4 e 6 meses (Coutinho, 2015).

Capítulo 5

Caso de Estudo

5. CASO DE ESTUDO

5.1. Convento de Santa Cruz, Ermidas, Via sacra e Hotel Real da Mata Nacional do Buçaco

O caso de estudo da presente dissertação situa-se na Mata Nacional do Buçaco, esta que possui uma grande riqueza e diversidade quer no património edificado, quer no património natural possuindo também o mais vasto conjunto arquitetónico edificado desde sempre pela Ordem dos Carmelitas Descalços, um conjunto monumental, classificado como Imóvel de Interesse Público onde se destaca o Convento de Santa Cruz, as ermidas de habitação, as Capelas de devoção e os Passos que compõem a Via Sacra, e por ultimo o Hotel Palácio. A mata nacional possui ainda uma das maiores coleções dendrológicas da Europa que fazem dela uma das matas nacionais mais interessantes de Portugal (Lopes, 2012).

A Ordem dos Carmelitas Descalços, no início do séc. XVII, mais propriamente em 1625, quis construir em Portugal um local onde os monges pudessem desfrutar uma vida contemplativa em comunhão espiritual em retiro. A esse local era atribuído o nome de “deserto”, sendo este constituído por um convento e ermidas de habitação (Gomes, 2005) (Ferreira, 2014).

A procura do lugar mais adequado para servir a esse propósito, foi iniciada em 1625, sendo inicialmente oferecidos à Ordem a Serra de Miranda do Corvo, e uma grande mata no lugar do Pereiro, muito perto da Cidade de Coimbra, mas a ordem já teria um lugar em mente: Serra de Sintra (Gomes, 2005) (Castro, 1896) (Ferreira, 2014).

O responsável pela escolha do lugar, ficou incumbida a um Padre, que partiu para Lisboa com os olhos postos na serra de Sintra. A sua proximidade com o mar não traria segurança contra ataques de piratas, corsários, e armadas inimigas, a proximidade da corte não o tornavam um local espiritual, e o ar salgado não era bom para a plantação de árvores exóticas, que os Carmelitas Descalços tanto apreciavam (Ferreira, 2014).

Numa visita de frei Ângelo de S. Domingos, reitor do colégio dos Carmelitas Descalços de Coimbra, ao bispo desta cidade, D. João Manuel, este lhe falou em umas matas e terras que tinha na Serra do Luso e que caso agradassem as doaria, pois era do seu interesse ter no seu bispado tal convento, e este lugar tinha o nome de Buçaco. (Ferreira, 2014).

O Buçaco preencheu por completo os requisitos impostos para a construção do “deserto”, devido a sua enorme variedade de árvores, abundância em água, e isolamento, chegando mesmo a ser considerado como um futuro paraíso “terreal” pelo Padre Geral dos Carmelitas Descalços (Ferreira, 2014).

Com a decisão tomada por parte da Ordem dos Carmelitas Descalços, faltava a aprovação do Papa e do Rei. A aprovação do Papa Urbano VIII, Papa da época, foi conseguida na normalidade, já a aprovação do Rei, Filipe III (IV de Espanha) foi muito difícil, devido à crise económica que proibia a fundação de novos conventos. A autorização foi conseguida após a desistência dos Carmelitas Descalços na fundação de outro convento aprovado, mas que nunca tinha passado das intenções, o convento de Tomar (Ferreira, 2014).

A primeira parede do convento foi lançada a 7 de agosto de 1628. A 28 de fevereiro de 1629 é inaugurada a biblioteca do convento que servira como igreja provisória. A 19 de março de 1630 começa a vida normal da comunidade religiosa. Com o passar dos anos os Carmelitas Descalços, com a ajuda de piedosos benfeitores, conseguiram concluir outras obras como muros, portas de entrada na mata, ermidas, capelinhas, ruas extensas e fontes, que vieram enobrecer ainda mais o “deserto” (Ferreira, 2014) (Castro, 1896).

Devido à extinção das ordens religiosas, no séc. XIX, em 1834, o convento foi transformado num quartel, até que em 1888 ele foi parcialmente destruído para dar lugar ao Hotel Palace (Ferreira, 2014) (Gomes, 2005). Assim, secções do convento como a livraria, hospedaria e refeitório foram assim demolidas. Permanecem ainda de pé a entrada do convento, o claustro e a igreja em forma de cruz no seu centro (Figura 9a)). Na Portaria do convento, foi construído um átrio de forma quadrangular e no seu centro eleva-se uma cruz de cantaria sobre peanha de granito grosseiro. A fachada principal do convento é constituída por um muro de pouco altura, interrompido por três arcos, sendo o arco do meio maior que os laterais (Figura 9b)).



a)



b)

Figura 9 – a) Planta do Convento de Santa Cruz. (Monumentos, 2013); b) Portaria do Convento. (Camara da mealhada, 2013)

O convento possui uma arquitetura humilde, e os materiais usados são considerados os mais pobres. Um exemplo disso são as cortiças que cobrem tetos, bancos e paredes, e os embrechados, revestimento feito de pedras, pedaços de cerâmica ou conchas, que se encontram na entrada para o convento (Ferreira, 2014).

O edifício do Palácio Hotel do Bussaco é de inspiração manuelina construído a partir de um projeto da autoria do arquiteto italiano Luigi Manini, cenógrafo do Teatro Nacional de São Carlos em Lisboa (Figura 10).

O Palácio é uma edificação neomanuelina, construída entre 1888, ano da aprovação do projeto de Luigi Manini, e 1907. Este é constituído por um conjunto arquitetónico, botânico e paisagístico único na Europa e já granjeou uma reputação que atualmente fazem dele um dos mais belos e históricos hotéis de todo o mundo (Fundação Mata do Bussaco, 2012).

Devido a esta importante riqueza arquitetónica e histórica, o Estado Português, reconhecendo o seu valor patrimonial, classificou-o, em 1996, como Imóvel de Interesse Público.

Tal como acontece com outros projeto de Manini, o Palácio Hotel do Bussaco exibe uma série de elementos arquitetónicos destinados a evocar a portugalidade e o simbolismo em torno do império. Manini inspirou-se na Torre de Belém e no Claustro dos Mosteiro de Santa Maria de Belém, para criar no Buçaco uma obra que não pode ser considerada apenas como um neo, mas sim como uma recriação eclética que denota aspetos historicistas, mas pouco relacionados com o retorno ao passado ou a ideias românticas.

Segundo documentação, o material usado na construção do Palace hotel tem origem em pedreiras de calcário de " Portunhos, Ançã e Outil (concelho de Cantanhede), mais concretamente dolomito (ANACLETO, 2004, p.66) (Fundação Mata do Bussaco, 2012).



Figura 10 - Hotel Palace Bussaco; (<http://www.booking.com/hotel/pt/palace-do-bussaco.pt-pt.html>)

Outras construções que se pode encontrar na Mata do Buçaco são as ermidas de habitação, estas iam sendo construídas ao longo dos anos com ajuda de piedosos benfeitores, sendo estas características de todos os “desertos” fundados pela Ordem dos Carmelitas Descalços. Não são conhecidas as datas de fundações de todas estas construções, mas pela datação de algumas delas podemos afirmar que foram fundadas a partir dos anos 40, no séc. XVII (Fundação Mata do Bussaco, 2012)

As ermidas permitiam aos religiosos, ir viver para um local completamente separado, longe da comunidade do convento, e onde poderiam estar mais perto das suas crenças. Os religiosos podiam assim ter uma vida mais árdua e solitária do que a vida ordinária do

convento, razão de serem construídas “longe” do convento no meio do mais variado arvoredado (Ferreira, 2014).

A estas construções eram lhes atribuídos nomes, na sua maioria em homenagem a Santos carmelitas e a Santos ermitões. Ao todo foram construídas onze ermidas com os seguintes nomes: Ermida de Santo Elias, de Santa Teresa, de S. João Baptista, de S. Miguel, de São José, de Nossa Senhora da Conceição, do Sepulcro, do Calvário, de Nossa Senhora da Expectação, do Santíssimo Sacramento, e de Nossa Senhora da Assunção (Fundação da Mata do Bussaco, 2012).

Na sua grande maioria têm em planta uma forma quadrada onde possuíam um oratório, um local de descanso, um local onde os religiosos podiam preparar a sua comida e se aquecer, e uma sacristia. Anexado à ermida havia uma pequena horta onde podiam cultivar os seus alimentos. À semelhança do convento estas ermidas também têm o teto coberto de cortiça no seu interior (Figura 11) (Ferreira, 2014).

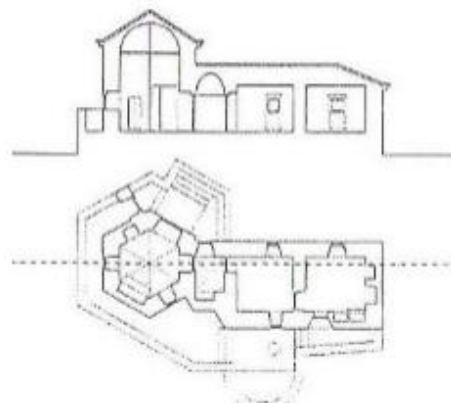


Figura 11 - Ermida de S. José

A ermida do Calvário foge a este estilo distinguindo-se notavelmente de todas as outras. Fundada em 1694 por D. João de Melo, e pretende homenagear o momento da crucificação de Jesus. Em planta, esta ermida exhibe uma forma hexagonal e uma forma quadrangular “amarrada” a esta (Figura 12). A parte hexagonal corresponde ao oratório, onde o seu teto eleva-se numa cúpula hexagonal, ficando superior ao resto da ermida. A parte quadrangular diz respeito a um lavatório, uma casa de fogo, e uma sala de descanso. No seu exterior existe um miradouro sobre a vasta mata do Buçaco (Figura 6). O exterior e interior da ermida é decorado com embrechados. (Gomes, 2005) (Castro, 1896) (Ferreira, 2014).



a)



b)

Figura 12 – a) Fachada principal da ermida do Calvário; b) Planta e corte da ermida do Calvário; b) Planta e corte da ermida do Calvário; (Gomes, 2005) (Ferreira, 2014);

Outras construções presentes na Mata do Buçaco, são as conhecidas capelas, que constituem a Via-Sacra do Buçaco.

A Via-Sacra data do final do séc. XV e é uma criação italiana que pretende fazer uma representação dos Passos percorridos por Jesus Cristo, desde da sua condenação (Passos da Prisão) até à sua crucificação (Passos da Paixão) (Fundação da Mata do Bussaco, 2012).

O Reitor da Universidade de Coimbra, Bispo-Conde Manuel de Saldanha, foi quem introduziu esta representação a partir de 1644. Inicialmente os passos eram marcados com uma cruz de madeira do Brasil e um letreiro com a descrição do Passo. Posteriormente, antes de 1695, D. João de Melo ordenou a construção de capelas substituindo assim as cruzes (Ferreira, 2014).

As distâncias entre os diferentes momentos do percurso, são fielmente reproduzidos, com uma extensão total de cerca de três quilómetros. A evolução da Via-Sacra continua com a inclusão dos Passos de Cedron (que não consta nas sagradas escrituras): a Porta de Siloé, a Porta Judiciária, o Pretório, o Calvário. Este conjunto e a vegetação envolvente torna a Via-Sacra do Buçaco única em todo o mundo (Fundação da Mata do Bussaco, 2012).

Os passos que compõem a Via-Sacra do Buçaco, são vinte, sendo os primeiros seis referentes aos Passos da Prisão, e os restantes destinam-se à representação dos Passos da Paixão de Cristo (Fundação Mata do Bussaco, 2012).

As capelas da Via-Sacra do Buçaco têm em planta uma forma quadrada, de pequena dimensão, com telhado em quatro águas. São construídas em pedra, e decoradas exteriormente com faixas de embrechados (Figura 13). Em contraste com estas capelas está a varanda de Pilatos, com uma escadaria de 28 degraus no seu interior, representando os degraus que Jesus subiu até à Varanda de Pilatos (Figura 14) (Gomes, 2005) (Ferreira, 2014)



Figura 13 – Capela Via Sacra



Figura 14 – Varanda de Pilatos (Camara municipal da Mealhada, 2013)

Dentro das capelas encontra-se a representação correspondente a cada momento, que inicialmente eram representadas por pinturas, sendo substituídas por figuras produzidas a mando de D. António Vasconcelos. Essas figuras foram destruídas com o passar dos anos, tendo sido encomendadas novas esculturas a Rafael Bordalo Pinheiro, que devido a falta de financiamento e sua morte, foram executadas apenas nove cenas dos passos da paixão, e da prisão, que nunca chegaram a ser instaladas no Buçaco. Por fim, já no séc. XX, o escultor Costa Mota criou figuras de barro para as capelas dos passos. (Fundação da Mata do Bussaco, 2012).

Para além destas obras mencionadas do “deserto” Carmelita Descalço do Buçaco, este contém outras obras de grande importância, como fontes, de onde se destaca a escadaria da Fonte Fria, Capelas, Portas de entrada na mata do Buçaco, e a Cruz Alta (Fundação Mata do Bussaco, 2012).

Na mata do Buçaco foi onde ocorreu a 27 de Setembro de 1810 a famosa Batalha do Buçaco, onde o exército anglo-luso, liderado pelo Tenente-general Arthur Wellesley, combateu contra a terceira invasão francesa, comandada pelo Marechal André Masséna. No final a vitória tendeu para o lado anglo-luso (Ferreira, 2014) (Castro, 1896) .

5.1.1. Estado de conservação do edificado

Edifícios com muitos anos de vida, como é o caso dos edifícios na Mata do Bussaco, com centenas de anos, sofrem danos na sua estrutura e revestimentos. A causa desses danos pode ser tanto a ação humana como fenómenos naturais. Quando se fala de causas humanas referimo-nos, por exemplo, a vandalismo, intervenções para instalação de tubagens, explosões, ou como no caso do convento, demolição parcial para dar lugar ao Hotel Palace. Temporais, humidade, são causas naturais que podem originar danos no edifício. Um exemplo de causa natural são os ciclones, um ocorrido a 15 de fevereiro de 1941, causando muito prejuízos que foram recuperados pelo Estado Português, ocorrendo obras de reconstrução e plantações, e mais recentemente a ciclogénese explosiva de 19 de janeiro de 2013 (Ferreira, 2014).

5.2. Enquadramento geográfico

O enquadramento geográfico da Mata do Buçaco apresentado foi feito com base nos dados existentes no Plano de Gestão e Ordenamento da Mata Nacional do Buçaco de 2009 e segundo o Mapa geológico de Portugal de Sequeira e Medina de 2004 (Lopes, 2012).

A Mata do Buçaco apresenta uma exposição predominantemente a norte (Anexo I). Localiza-se no extremo noroeste (NW) da Serra do Buçaco (também conhecida por Serra do Luso ou Serra de Carvalho), a 40° 22'N e 8°22'W, a 40 km do litoral atlântico, na freguesia do Luso, concelho da Mealhada, distrito de Aveiro (Figura 15). Possui relevo moderado e desenvolve-se entre as cotas 250 e 560 m (Anexo II) (Lopes, 2012). Compreende uma área florestada com uma superfície de aproximadamente 105 ha, um comprimento máximo de 1450 m e largura máxima de 950 m, entre a Porta de Sula e as Portas de Coimbra. Com base na análise da carta hipsométrica da MNB (Anexo III), a cota mais alta da Mata do Buçaco é de 547 m (vértice geodésico da Cruz Alta) e a cota mais baixa é de 190 m (Porta das Ameias) (Lopes, 2012).

A Mata Climácica situa-se numa zona de moderado relevo, isto é, entre 350 a 550 m, tendo na classe dos 450 a 500 m maior expressividade (Lopes, 2012).

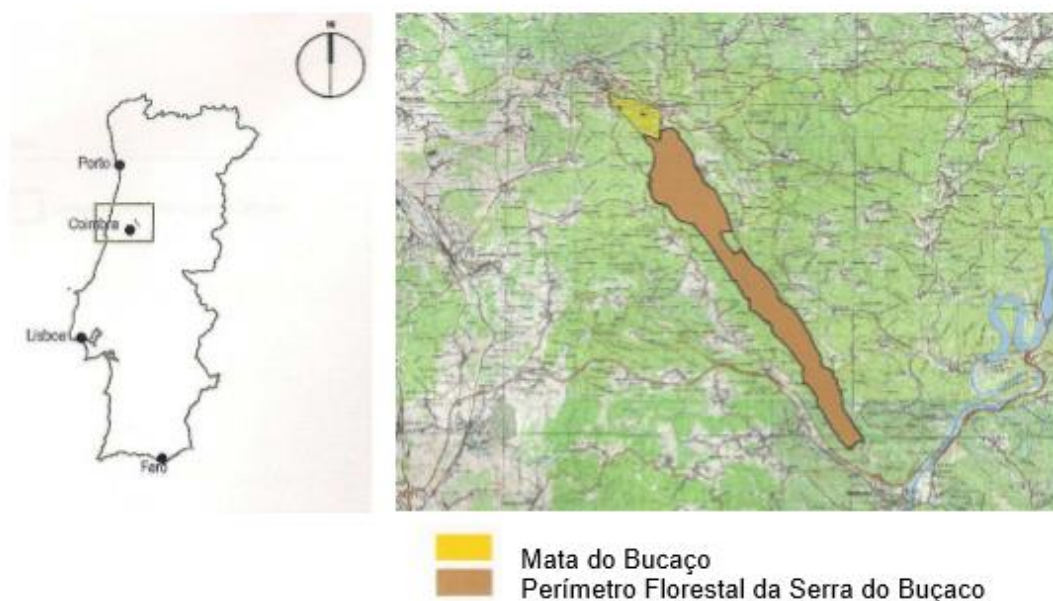


Figura 15 . Enquadramento geográfico da MNB (adapt. da Carta de Localização (1/100 000, do POg da MNB, 2009) (Lopes, 2012)

5.3. Clima da Mata do Buçaco

Os valores médios dos vários elementos climáticos registados na estação climatológica, que esteve em funcionamento na Mata do Buçaco durante cerca de 16 anos (de 1926 até 1942), tendo sido publicados pelo Instituto de Meteorologia e Geofísica (I.N.M.G.) e pelo Observatório do Infante D. Luís, foram a base para a caracterização climática (AFN, 2009)

A Mata do Buçaco tem uma precipitação média de 1525.4 mm. A precipitação máxima mensal é de 225.2 mm em Dezembro, sendo o mês de Janeiro, o segundo mais chuvoso com 221.5 mm. O mês mais seco é Agosto com 20.4 mm, seguido de Julho com 25.0 mm (Lopes, 2012).

Em relação à temperatura média anual, esta é cerca de 14.0° C com um máximo de 21.4° C em Agosto e um mínimo de 7.6° C em Janeiro, o que se traduz numa amplitude térmica anual de 13.8° C. A temperatura máxima absoluta foi registada em Agosto, e atingiu o valor de 40.4° C. A temperatura mínima absoluta registada foi de -3.1° C, em Fevereiro (Lopes, 2012).

O valor médio anual da humidade relativa do ar é de 80.2 %, com um máximo de 88.4 % em Novembro e um mínimo de 71.0 % em Julho. Os ventos dominantes são de NW, logo seguidos dos de Sudeste (Lopes, 2012).

5.4. Bioclimatologia da Mata do Buçaco

A bioclimatologia é uma ciência ecológica, que estuda as relações entre o clima e a distribuição dos seres vivos na Terra.

Devido à elevada correlação entre bioclima e vegetação, surge a possibilidade de, para qualquer ponto da Terra, prever o tipo de vegetação que aí ocorre a partir de dados bioclimáticos ou, alternadamente, produzir uma caracterização bioclimática a partir da vegetação desse local (Rivas-Martínez et al., 2001, Lopes, 2012).

O sistema de classificação bioclimático utilizado neste trabalho baseia-se na Classificação Bioclimática da Terra, de Rivas-Martínez (2004).

Existem cinco macroclimas na Terra, que são, o Tropical, o Mediterrâneo, o Temperado, o Polar e por último o Boreal, em que se subdividem em vinte e sete bioclimas. Portugal Continental possui 2 macroclimas, o Temperado a NW e Mediterrânico na restante parte do país. (Figura 16) (Lopes, 2012).



Figura 16 - Mapa Macrobioclimas da Europa (S. Rivas - Martínez, A. Penas & T.E. Diaz (2004), http://www.ucm.es/info/cif/form/bi_map/index.htm), (Lopes, 2012);

À medida que as fronteiras das séries de vegetação vão sendo conhecidas e cartografadas, os valores limite dos elementos climáticos que os determinam podem ser estatisticamente calculados.

O método tradicional para o fazer é através da comparação de cartas de vegetação natural potencial com mapas de isolinhas dos vários parâmetros ou índices considerados relevantes. Ou seja, uma vez definido um modelo bioclimático, a cartografia das unidades bioclimáticas presentes em determinado território é possível através de duas abordagens distintas: a partir de um conhecimento profundo da vegetação natural desse território ou com base nos dados climáticos disponíveis para essa área (Lopes, 2012).

O mapa da Fig. 17, apresenta uma versão realizada em 2004, para a Península Ibérica dos bioclimas, segundo Rivas-Martínez. Como podemos constatar pelo mapa, Portugal Continental possui um bioclima Mesotemperado (Mt) a noroeste, Mesomediterrânico (Mm) a Nordeste, Centro e Sudeste do território, sendo o termotipo predominante no nosso território, e Termomediterrânico (TM) para sudoeste e sul (Lopes, 2012).

A Mata do Buçaco, localiza-se numa zona de transição entre o bioclima Mesotemperado e Mesomediterrânico. Esta localização confere à Mata Climácica um microclima muito particular, com temperaturas amenas, elevada precipitação e frequentes nevoeiros matinais, que favorecem a ocorrência de elevada diversidade florística (Lopes, 2012).

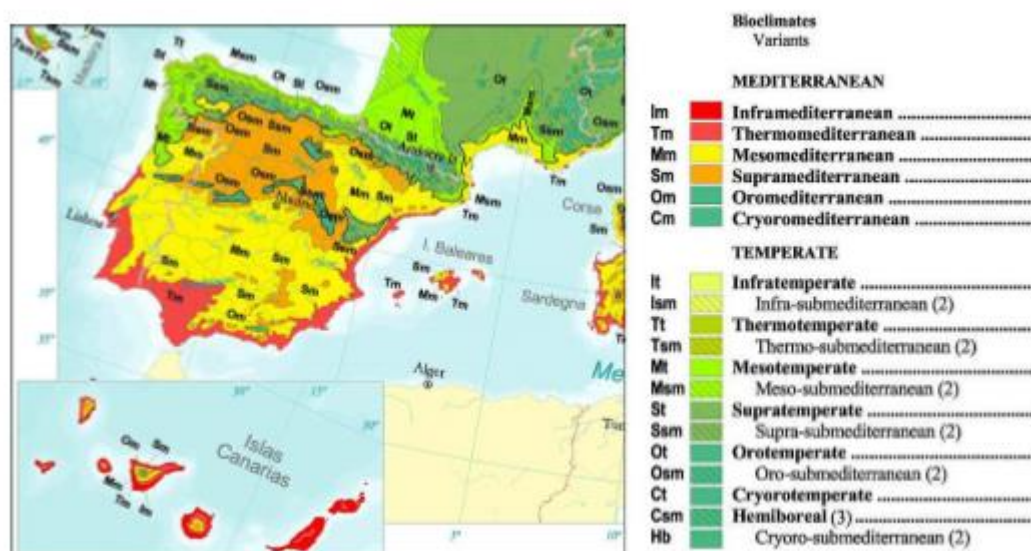


Figura 17 – Bioclimas da Península Ibérica (Adap. de Bioclimas Map of europe. S. Rivas- Martinez, A. Penas&T.E. Díaz (2004), Lopes, 2012)

5.5. Técnicas de construção

As técnicas construtivas mais utilizadas nas construções do Convento de Santa Cruz e na Via Sacra do Buçaco são os trabalhos em embrechados e a utilização de cortiça, ambas com objetivo numa vertente estética e decorativa, e com uma importância histórica muito relevante, como são os embrechados, relacionados com construções realizadas na Antiguidade clássica. A revestimento de cortiça nos tetos, paredes, bancos e portas, é meramente decorativo mas pode conferir um melhor desempenho térmico, embora esta mais valia possa não ter sido colocada com objetivo no momento da construção (Ferreira, 2014).

Não existem referências sobre o tipo de rochas utilizadas na execução das paredes de alvenaria, mas como esta ordem religiosa eram conhecidas pelo aproveitamento de recursos locais, é possível que as pedras utilizadas fossem quartzitos, calcários e arenitos, presentes na mata do Buçaco e arredores, como foi verificado na carta geológica de Portuga (LNEG, 2010). Estas pedras as eram colocadas umas em cima das outras de forma a que ficassem bem

acomodadas e estáveis, sendo os espaços entre elas preenchidos com argamassa de assentamento com ligante de cal aérea (Ferreira, 2014).

A altura das paredes nas construções das ermidas de habitação e capelas da Via-Sacra, não são muito elevadas, principalmente nas capelas da Via-Sacra, assim como as próprias dimensões em planta. Tanto janelas como portas, nestes edifícios têm dimensões reduzidas, as portas com cerca de 1,79 m de altura e 0,9 de largura, e as janelas com 0,66 m de altura e 0,56 m de largura, e os seus contornos são realizados com pedras de cantaria com formas retilíneas (Ferreira, 2014). O revestimento das paredes, interiores ou exteriores, é feito com argamassa de cal aérea. Nas paredes exteriores das capelas, para além de revestimento de argamassa de cal aérea foram executados embrechados utilizando fragmentos de pedra e argamassa de cal aérea (Ferreira, 2014).

As dimensões das paredes, janelas e portas no Convento de Santa Cruz são um pouco superiores. As janelas e portas também são contornadas com pedras esculpidas, e o revestimento de paredes é efetuado com argamassa de cal aérea, principalmente nas paredes interiores e exteriores do claustro, e embrechados, nas paredes de entrada do convento (Ferreira, 2014).

No Convento de Santa Cruz, ermidas de habitação e capelas da Via-Sacra, os materiais utilizados na cobertura são os mesmos, madeira e telhas cerâmicas em canudo.

A estrutura da cobertura é toda realizada em madeira e está assente no topo das paredes de alvenaria. Característico à data de construção, época essa onde não existia tecnologia de serragem como a atual, a secção transversal de cada um dos elementos que compõem a estrutura da cobertura apresenta uma forma aproximadamente circular, semelhante à secção transversal do tronco da árvore originária.

Sobre a estrutura da cobertura eram posteriormente colocadas telhas canudo, com um aspeto muito artesanal, com dimensões características e não precisamente idênticas umas às outras.

Nas capelas da Via-Sacra e ermidas de habitações, as telhas têm uma disposição normal para telhas em canudo, com fileiras de telhas com a parte côncava voltada para cima e outras fileiras de telhas com a parte côncava voltada para baixo a sobrepô-las (Figura 18 a)).

Já no convento encontramos uma disposição particular, nomeadamente na cobertura do claustro, onde existe uma disposição como a referida anteriormente, mas sobre essa disposição são colocadas outras fileiras de telhas com a parte côncava virada para cima e a junção entre fileiras é efetuada com argamassa (Figura 18 b)).

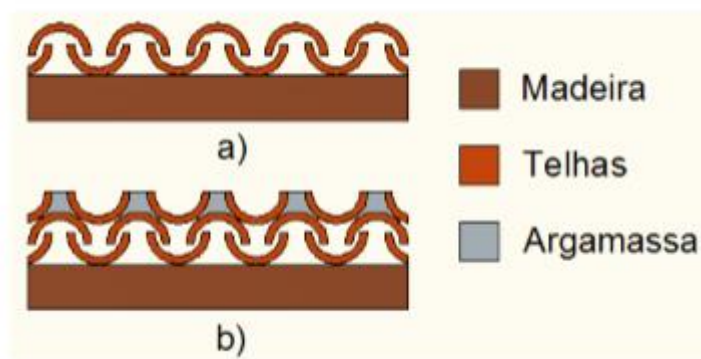


Figura 18 - a) Disposição das telhas nas Capelas e Ermidas de habitação; b) Disposição das telhas no Convento (Ferreira, 2014);

O Revestimento decorativo, designados como embrechados, tornaram-se muito comuns em Portugal, frequentemente encontrados em revestimento de nichos, fontes, outros lugares com água e mais raramente no interior de capelas.(Albergaria, 1997).

Como se pode observar na Figura 19, o Convento de Santa Cruz do Buçaco possui estes trabalhos em embrechados na entrada do próprio convento, nas várias portas de entrada da mata do Buçaco (Figura 20), na escadaria da fonte, nas fontes de água, e nas capelas que compõem a Via Sacra do Buçaco.

Os embrechados são constituídos por pequenos fragmentos de basalto, quartzo, escórias ferruginosas, e cerâmica. (Fundação da Mata do Bussaco, 2012). As ilustrações nos embrechados dos edifícios do Buçaco variam consoante o edifício. Nas capelas da Via-Sacra os embrechados delimitam os contornos da capela, janelas, e portas, com uma faixa de fragmentos brancos (quartzo) e outra de faixa de fragmentos escuros (pedras vulcânicas ou jorra).

Nas portas de entrada na mata do Buçaco e no Convento é possível observar que estão representados nos embrechados símbolos de cariz religioso. Também é possível observar ilustrações de natureza e vários padrões.



Figura 19 - Embrechados no muro da portaria



Figura 20 - Embrechados da porta de Coimbra, Convento de Santa Cruz, Bussaco (Luso Tapada do Buçaco, 2012)

Outro elemento utilizado nas técnicas construtivas dos edifícios do Buçaco é a cortiça. A cortiça tem muitas e ótimas características que a tornam num material muito útil na área da construção civil. É um material leve e elástico, tornando-o fácil de ser manuseado, é impermeável a líquidos e gases, é um bom isolante térmico, elétrico e acústico. Para além disso, tem um bom desempenho à compressão não ocorrendo praticamente expansão lateral, é inócuo e praticamente imputrescível (Gil, 2006).

Com estas características, a cortiça tem imensas aplicações na construção civil. É utilizado como revestimento de pavimentos, garantindo um aspeto estético interessante e uma ótima durabilidade (Gil, 2006).

A cortiça é aplicada em edifícios como isolante acústico, devido ao seu bom desempenho acústico aéreo, reduzindo muito significativamente o tempo de reverberação, e bom desempenho em som de percussão, reduzindo a transmissão de som por impacto.

Outra aplicação da cortiça em construção é a sua utilização como isolante térmico. A cortiça reduz muito significativamente a transmissão térmica entre o exterior e interior de uma habitação, reduz a condensação superficial, e para além disso, tem uma boa inércia térmica, permitindo maior permanência de calor ou frio.

Como já foi referido neste capítulo, é possível observar no Convento de Santa Cruz e nas ermidas de habitação que os tetos, e algumas paredes, são revestidos de cortiça. Afirmar que a utilização de cortiça nestes edifícios está diretamente relacionada com um melhor isolamento térmico é um pouco arriscado, pois a cortiça naquela época era considerada um material pobre. Provavelmente a utilização de cortiça como revestimento de tetos, paredes e bancos, está mais relacionada com questões eminentemente doutrinárias e estéticas associadas a serem produto de árvores autóctones, mas considerando a ideia de que a aplicação desta tivesse sido com o objetivo de um bom comportamento térmico, não deixa de ser interessante, visto que se está a falar de edifícios que datam do séc. XVII é muito impressionante.

A ordem religiosa construía utilizando materiais considerados pobres e que davam uma estética agradável, mas também tiravam, consciente ou inconscientemente, partido das características físicas desses materiais para um melhor desempenho, neste caso térmico (Ferreira, 2014).



Figura 21 - Teto da portaria do Convento executado em cortiça.

Capítulo 6

Trabalho de Campo

6. TRABALHO DE CAMPO

6.1. Identificação do tipo de Colonização Biológica

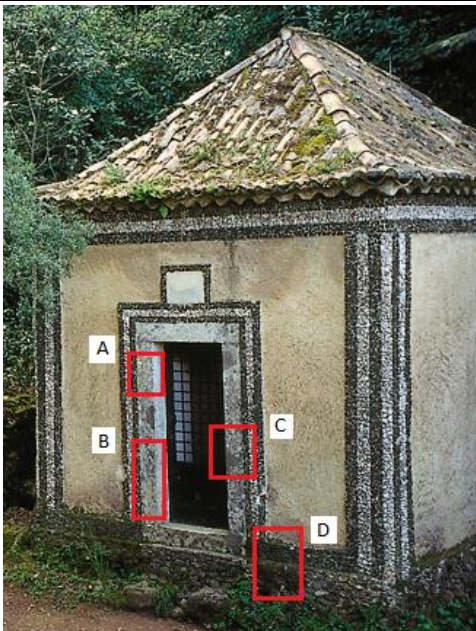


Na zona da Mata Nacional do Buçaco, procedeu-se à caracterização do tipo de colonização biológica presente nos objetos de estudo (Convento de Santa Cruz, Bussaco Palace Hotel e duas Capelas da Via Sacra), inicialmente só pela observação das espécies, mas em alguns casos foi necessária a recolha de amostras para uma observação microscópica e isolamento em meios de cultivo para a sua identificação mais pormenorizada.

De seguida são apresentadas tabelas síntese, do tipo de presença biológica encontrada no Convento de Santa Cruz, Capela 1 Via Sacra, Varanda de Pilatos (Capela 2) e Palácio Hotel do Buçaco.

Como era de prever a colonização biológica nestes edifícios, não é muito diferente uns dos outros, sendo que nas Capelas da Via Sacra, como estão no meio de uma zona florestal, as árvores contribuem com fungos para estas colonizações, criando efeito de sombra o que favorece o desenvolvimento de fungos e algas o que explica a abundância e a diversidade de seres vivos.

A orientação solar dos edifícios tem muita influência no tipo de seres que se desenvolvem nas suas fachadas, quanto mais sombria for a zona, maior a humidade ou seja maior a presença de fungos, algas e outros, diferente das zonas com maior exposição solar diária, que terá menos predisposição para se desenvolver colonização biológica.

Tabela 3 - Colonização biológica, Capela 1 Via Sacra;

Localização - Capela 1 Via Sacra		
		
Colonização Biológica		
A)		<p>Recolheu-se uma amostra neste local para ser observado microscopicamente, e ser cultivados em meio de cultura. Aqui encontramos uma diversidade de espécies de fungos.</p>
B)		<p>Presença abundante de diversas espécies de líquenes com várias colorações em vários pontos da capela.</p>



C)			Recolheu-se uma amostra neste local para ser observado microscopicamente, e cultivados em meios de cultura. Aqui encontra-se uma diversidade de espécies de fungos.
D)			Presença de Briófitas (musgos) em toda a extensão da capela.


Tabela 4 - Colonização biológica, Convento de Santa Cruz;



Localização – Convento de Santa Cruz	Colonização Biológica
	<p>Presença de Líquenes nos pilares e escadas exteriores, sendo estas uma combinação de dois organismos, um fungo e uma alga unicelular, que crescem como parceiros de uma associação benéfica para ambos.</p>
	<p>Através de uma observação macroscópica conseguimos perceber que estamos perante um tipo de alga, e após observação microscópica, chegou-se à conclusão que estamos perante uma espécie de alga designada por <i>Chlorella sp.</i></p>
	<p>Em toda a zona em contacto com o solo existe uma variedade de espécies sendo predominantes os briófitos.</p>

Tabela 5 - Colonização biológica, Varanda de pilatos, Capela 2;

Localização – Varanda de Pilatos. Capela 2	Tipo de Colonização Biológica
	<p>Aqui encontramos uma variedade de espécies, mas no interior da capela a presença mais predominante é de uma alga designada <i>Chlorella sp.</i></p>

Tabela 6 - Colonização Biológica, Palácio Hotel do Bussaco;

Localização – Hotel Palácio	Tipo de Colonização Biológica
	<p>Nas fachadas do Palace Hotel, a presença mais predominante é a de filmes negros, que representam uma colonização por uma grande diversidade de espécies de fungos.</p>

	<p>Na base do pilar exterior do Hotel conseguimos identificar a presença de líquenes, e musgos mais na zona em contacto com o solo.</p>
	<p>Na parte superior do pilar exterior, recolheu-se uma amostra para ser observado microscopicamente. Aqui encontra-se presente um tipo de líquen.</p>

6.2. Recolha de amostras

Para a identificação de alguns microrganismos que não foi possível identificar a olho nu, procedeu-se à recolha de amostras para serem analisadas em laboratório. Os métodos adotados é o esfregaço, com zaragatoas esterilizadas e mergulhadas em solução de *Ringer* para transporte, e raspagem com uma espátula para um tubo contendo soluto de *Ringer*, por se tratarem de métodos não invasivos da matriz de suporte e permitir grande versatilidade na escolha das zonas de amostragem.

Foram retiradas duas amostras de um dos pilares exteriores da fachada norte do Hotel Palácio (Figura 22), e uma amostra nas escadas do mesmo (Figura 23). No Convento foi retirada somente uma amostra na entrada, parte interior (Figura 24).

Foram escolhidas duas Capelas da Via Sacra, sendo que em cada uma delas foram retiradas duas amostras (Figura 25, 26).



Figura 22 – Pilar exterior do Hotel; a) Extração de amostras na parte superior do pilar; b) extração de amostras na parte inferior do pilar;



Figura 23 – a) Escadas Hotel. Localização de extração de amostras; b) Extração de amostras;

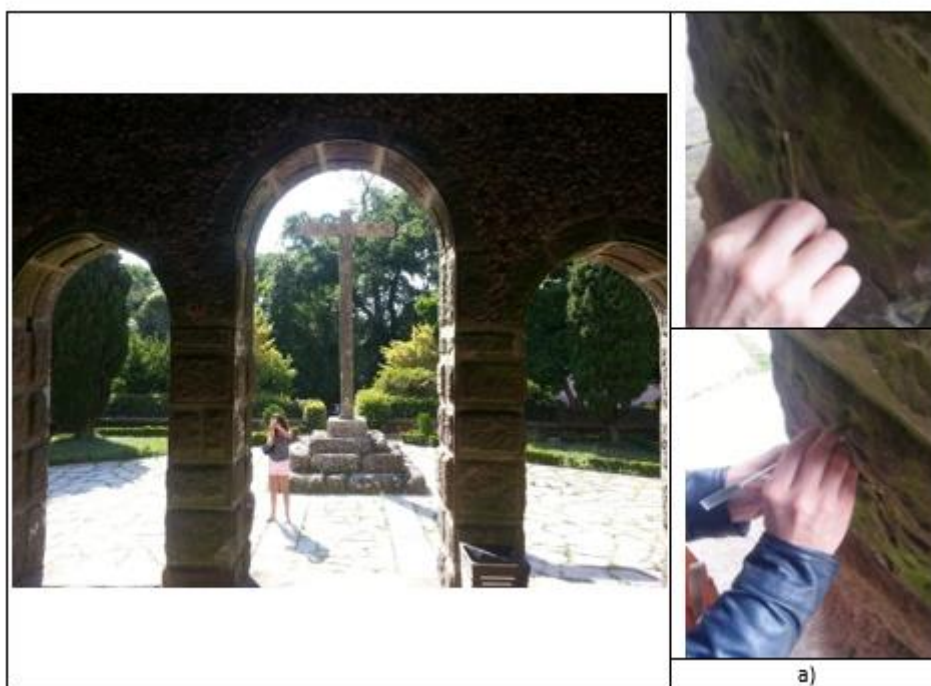


Figura 24 - Portaria do Convento, localização da extração de amostras; a) extração de amostras;



Figura 25 – Capela 1 Via Sacra; a) extração de amostras da ombreira da porta da capela 1 via sacra, b) extração de amostras da parede da Capela 1 Via Sacra;



Figura 26 – Varanda de Pilatos, Capela 2 ; a) extração de amostras da ombreira da porta da capela 2 Via Sacra; b) extração de amostras da parede da Capela 2 Via Sacra;

6.3. Isolamento e meios de cultura

Inicialmente, como descrito anteriormente, recolheu-se as amostras com auxílio de zaragatoas e posteriormente fez-se a inoculação das superfícies das placas de Petri, com as mesmas zaragatoas. Utilizaram-se dois meios de cultura diferentes, para isolamento de bactérias e fungos. Para o isolamento de bactérias foi usado o meio de cultura PCA (plate count agar), e para os fungos PDA (potato dextrose agar).

Os meios de cultura possibilitam a multiplicação de microrganismos em laboratório sob condições controladas, o que permite o seu isolamento e caracterização morfológica e bioquímica. As exigências metabólicas do mundo microbiano são muito diversificadas, pelo que os meios de cultura utilizados devem corresponder às exigências específicas do tipo de microrganismo que se quer cultivar. Em relação à sua composição química, os meios de cultura quimicamente complexos permitem a multiplicação da maioria dos microrganismos heterotróficos. Já em relação ao seu estado físico, os meios de cultura sólidos permitem não só a multiplicação, mas também o isolamento de microrganismos, de forma a obter culturas puras.

Posteriormente foram estabelecidas culturas puras com o Método de riscado em placa (Figura 27). As culturas puras podem ser obtidas através de vários métodos e visam o desenvolvimento de uma população a partir de uma única célula inicial. O método de riscado em placa é um método de isolamento bastante rápido que consiste no espalhamento de uma pequena porção de inóculo com uma zaragatoa, riscando na superfície do meio de cultura sólido. A execução do riscado pode ser feita de várias formas; o importante é que pelo menos uma célula fique isolada das restantes de forma a obter-se uma colónia derivada da multiplicação dessa célula original, isto é, constituída por células geneticamente iguais. Após crescimento das amostras inoculadas nestes meios, foram repicados microrganismos por forma a se obter o respetivo isolamento.

As placas que contêm vários isolados bacterianos e fúngicos retirados dos objetos de estudo, encontram-se representados respetivamente nas tabelas 7 e 8, com a designação atribuída, e as respetivas localizações da extração das amostras.

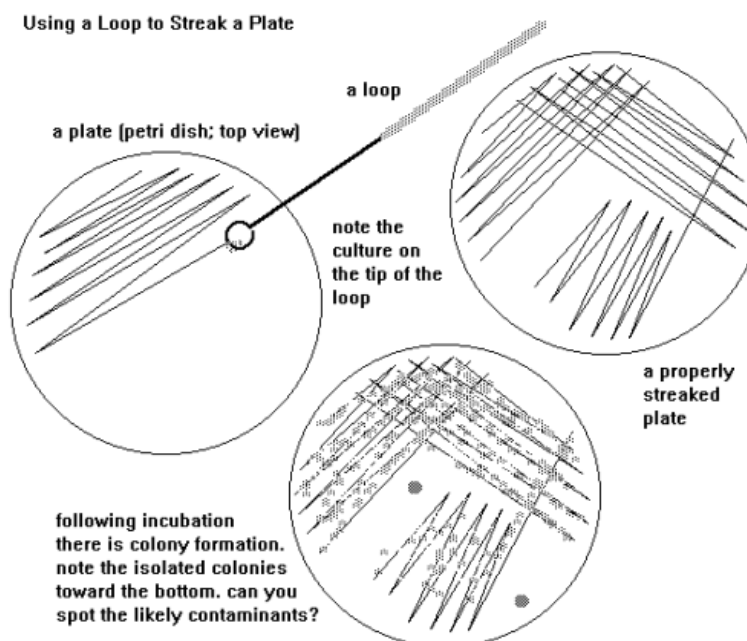


Figura 27 - Exemplo de um riscado em placa. Fonte <http://mansfield.osu.edu/~sabedon/biol4035.htm>

Tabela 7 - Designação e localização dos Isolados bacterianos;

Designação	Localização	Placas de isolamento bacteriano
B1	Hotel Escadas	
B2	Capela 2 Interior	
B3	Capela 2 Porta	


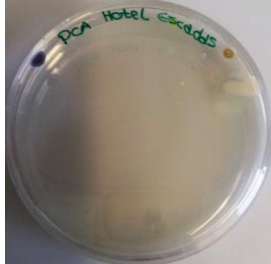
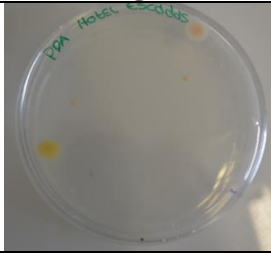



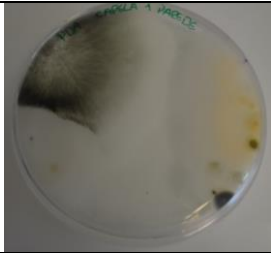

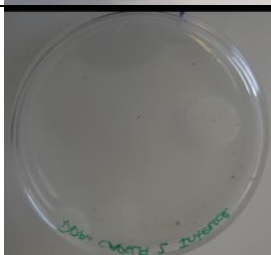
B4	Capela 2 Parede Exterior	
B5	Hotel Escadas	

Tabela 8 - Designação e localização dos isolados fúngicos;

Designação	Localização	Placas de Isolamento Fúngico
F1	Hotel Escadas	
F2	Capela 2 Porta	
F3	Capela 2 Parede exterior	
F4	Capela 1 Porta	

F5	Capela 1 Parede exterior	
F7	Convento pilar interior	
F8	Capela 2 Interior	

6.4. Biocidas selecionados

Inicialmente foram selecionados três biocidas normalmente usados em trabalhos de conservação e restauro, apresentando elevada eficiência e uma interferência mínima com o substrato pétreo, sendo eles o Cloreto de benzalcónico 50%, Algochene Pronto WS e HMK R162 (Tabela. 9).

O Cloreto de benzalcónico 50% é um biocida concentrado de pH neutro/ligeiramente básico à base de sais de amónio quarternário com ação desinfetante e detergente. A ação desinfetante do produto em relação à microbiota efetua-se por contacto, por interação com as membranas celulares dos microrganismos. Esta alteração da membrana provoca a impossibilidade por parte do microrganismo de controlar as trocas osmóticas vitais pelo que num período de tempo curto sobrevém a necrose. O seu modo de aplicação é mediante aspersão, pincelagem (ou compressas com polpa de celulose ou a densantes hidrossolúveis) sobre a superfície pétrea.

Deve se deixar atuar de acordo com as situações: a atuação é rápida (48-72 h a 20C), de seguida deve ser removido mecanicamente os resíduos da colonização biológica. A fim de

eliminar qualquer resíduo de biocida deve se efetuar o enxaguamento com água desmineralizada. Em caso de presença de muitas substâncias orgânicas, biofilmes, é aconselhável a repetição do tratamento, o produto não danifica as superfícies lapídeas e metálicas. Em caso de desinfestação de líquenes e cianobactérias, aconselha-se a nebulização da zona a tratar com água, algumas horas antes da aplicação do produto. Em caso de superfícies com sujidade tenaz, pode-se juntar à solução aquosa de cloreto de benzalcónico, amónio carbonato de 10 a 20%.

O biocida Algochene pronto ws, é um produto para tratamento e prevenção da contaminação por bactérias, algas verdes e castanhas, fungos, líquenes, sobre madeira, materiais lapídeos e tecidos. O princípio ativo apresenta um largo espectro de ação, ótima estabilidade à luz UV e insolubilidade em água, oferecendo proteção preventiva de longa duração. Em relação ao seu modo de utilização, pode ser aplicado em pincel, rolo, por percolação ou aplicado à pressão 0,2/0,3 bar evitando a nebulização.

Em relação ao biocida HMK R162 é um produto de limpeza especial e concentrado, sem cloro nem ácido, que remove algas persistentes e marcas causadas por plantas, de arruamentos, paredes, terraços, varandas, escadas em todas as pedras naturais e compostas. As componentes ativas de HMK R162 restringem o reaparecimento e asseguram que as superfícies ficam limpas de vegetação e algas durante mais tempo, podendo ser utilizado em superfícies polidas. Para a sua aplicação deve se assegurar que a superfície está fria e seca e aplica-se R162 diluído de 1:10 em água, de modo uniforme em toda a superfície a tratar, utilizando um pulverizador. As plantas e relvados deverão ser protegidos contra possíveis salpicos.

As fichas técnicas dos biocidas selecionados encontram-se no Anexo VII.

Tabela 9 – Biocidas selecionados

Biocida (nome comercial)	Ação	Princípio Ativo
Cloreto de benzalcónico 50%	Largo espectro	Solução de 50% de cloro de alqui-dimetil-benzil- amónio em água
Algochene pronto ws	Largo espectro	Solução de N-butil-1,2-benzisotiazolina-3 em White Spirit
HMK R162	Fungicida e algicida	Propanol

6.5. Testes aos biocidas

Após o isolamento dos microrganismos, os isolados foram utilizados para testar os biocidas comerciais, por forma a se avaliar a sua eficácia. Foram selecionados 3 agentes biocidas, mencionados no subtítulo 6.4, que são normalmente utilizados em trabalhos de conservação e restauro, sendo lhes apontadas as vantagens de apresentarem elevada eficiência e uma interferência mínima com o substrato pétreo (Tabela 9). Das amostras retiradas da superfície da pedra dos objetos de estudo, foi possível cultivar uma variedade de microrganismos.

Para a avaliação da eficácia dos diferentes biocidas foi usado o método de Kirby-Bauer (método de difusão em disco), utilizaram-se pequenos discos de papel absorvente, embebidos no biocida a testar.

Os padrões de resistência antimicrobiana dos isolados foram determinados pelo método de difusão em disco de ágar. As bactérias foram suspensas em NaCl estéril a 0,9% para uma turvação para corresponder a um padrão McFarland No. 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e estriadas em meio PCA. Em relação aos fungos, retirou-se um micélio da placa inicial do fungo, e colocou-se no centro de uma nova placa em meio PDA.

De seguida, colocaram-se os discos sobre as placas com os isolados fúngicos e bacterianos. As placas de teste aos biocidas, com os isolados fúngicos e bacterianos estiveram à temperatura ambiente. Após 96 horas, fez-se a observação do crescimento dos halos de inibição nos isolados bacterianos (exemplo ilustrativo Figura 28a)), já nos isolados fúngicos, os halos de inibição foram perceptíveis na segunda semana após a realização dos testes aos biocidas (exemplo ilustrativo Figura 28b)). Estes halos de inibição foram medidos e comparados, sendo tomados como indicadores da suscetibilidade do microrganismo ao biocida em causa. Quanto maior o halo, mais eficaz será o biocida.

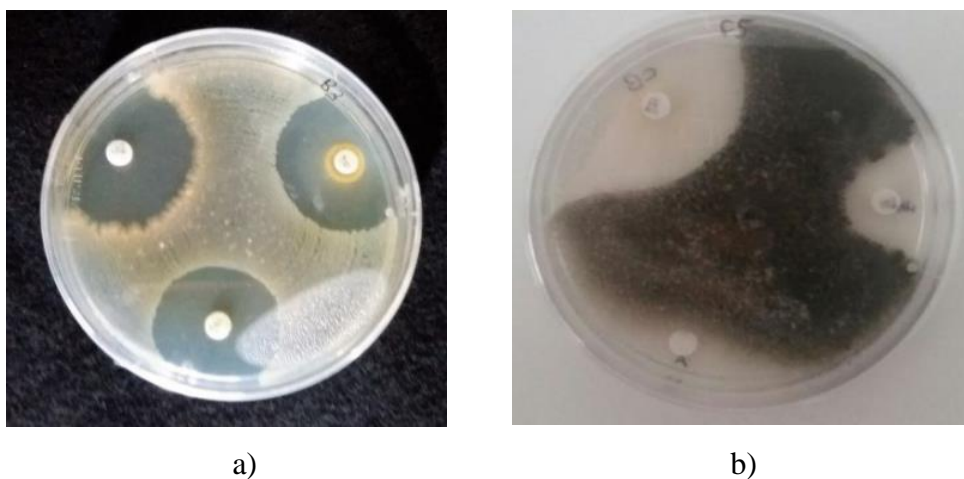


Figura 28 - Halos de inibição; a) teste aos biocidas num isolado bacteriano; b) teste aos biocidas num isolado fúngico;

Para a análise dos resultados relativos aos halos de inibição de crescimento bacteriano e fúngico, causados pelos discos embebidos em biocidas, construíram-se os gráficos apresentados, respetivamente nas Figuras 29 e 30 que ilustram a comparação entre os diferentes biocidas, respetivamente nos isolados bacterianos, e nos isolados fúngicos, sendo que no Anexo IV, encontram-se todas as placas de Petri com a medição dos halos de inibição.

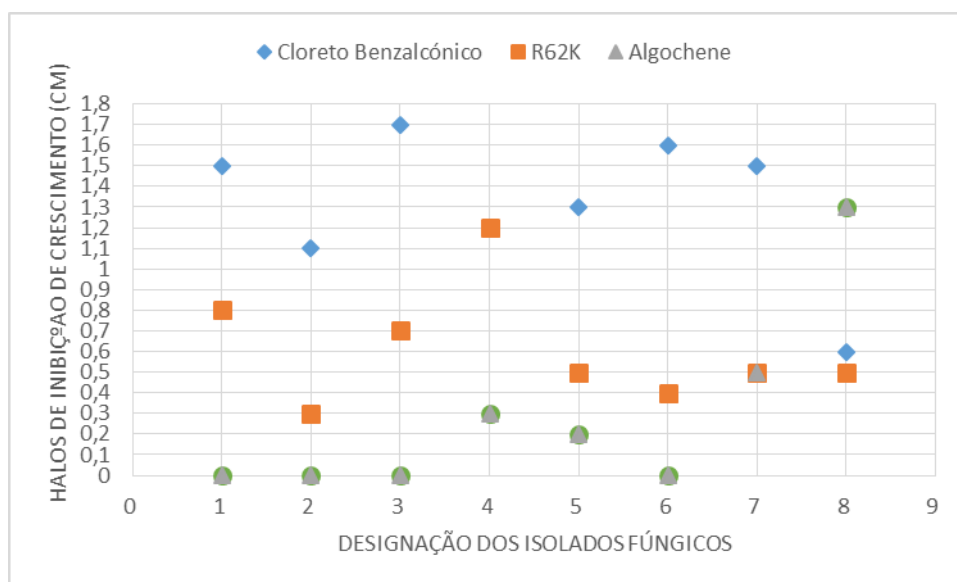


Figura 29 - Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados fúngicos.

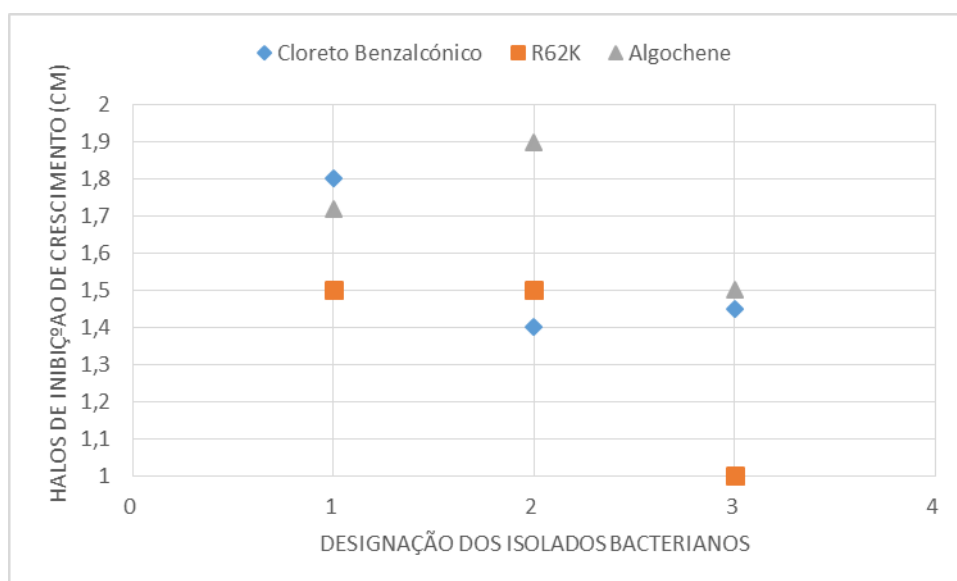


Figura 30 - Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas no diferentes isolados bacterianos.

A comparação entre os halos de inibição nos isolados bacterinos é bastante clara, em termos médios o Algochene Pronto ws tem um efeito superior ao do Cloreto benzalcónico 50%. Como seria de esperar o HMK R162 não apresentou resultados tão positivos, pois a sua área de atuação é mais concretamente em fungos ou algas, não em contaminações bacterianas.

Ao contrário do que se passou nos isolados bacterinos, o Algochene pronto ws teve os piores resultados nos isolados fúngicos, não existindo em muitas placas halos de inibição. O cloreto benzálconico foi o biocida com a melhor atuação nos fungos, sendo que em quase todas as placas teve os maiores diâmetros dos halos de inibição.

6.6. Testes aos biocidas *in situ*



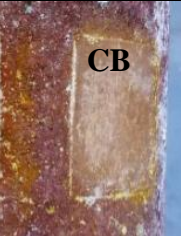















Para a realização dos testes *in situ*, selecionaram-se zonas em cada edifício em estudo. Visto que todas as capelas apresentavam o mesmo tipo de atividade biológica, optou se por aplicar os biocidas somente numa capela, designei como Capela 1 Via Sacra e na capela da Varanda de Pilatos, que designei como Capela 2.

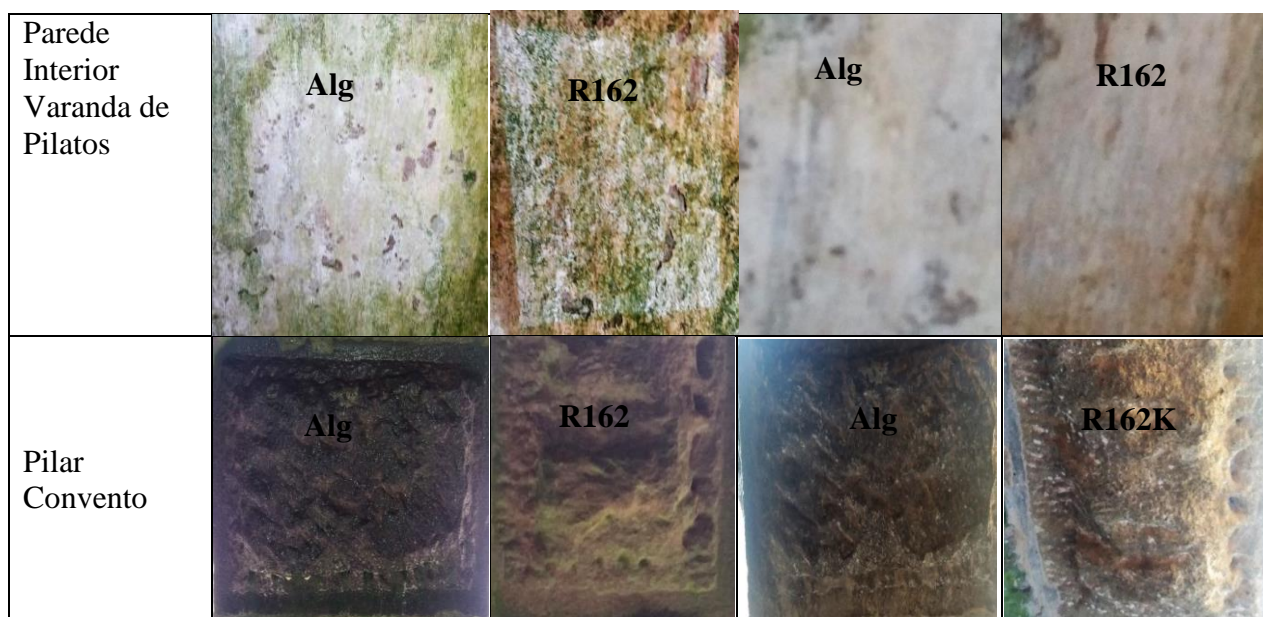
No Convento as zonas selecionadas para a aplicação dos biocidas situam se na entrada, onde é possível encontrar uma variedade de espécies, sendo as mais predominantes, líquenes, algas e musgos. As zonas selecionadas para aplicação do biocida no Bussaco Palace Hotel

situam se na fachada virada a Norte, pois é a zona com mais sombreamento, ou seja, mais húmida o que faz com que a presença de atividade biológica seja mais abundante. Em relação às capelas da Via sacra, como estão inseridas no meio de muita vegetação dificulta a entrada de luz solar, ou seja são zonas sombrias e húmidas, isto condicionada a secagem de certas zonas do edifício ocorrendo assim a formação de colonizações biológicas. As zonas de aplicação dos biocidas no que diz respeito às Capelas da Via Sacra, vão ser no exterior da Capela 1 Via Sacra, e no interior da Capela 2.

A aplicação dos biocidas foi feita por pincelagem, e foram selecionadas três áreas em cada objeto de estudo, com dimensões 3:3. A Tabela 10 sintetiza as zonas de aplicação dos biocidas, em que a designação CB que corresponde ao biocida cloreto benzalcónico 50%, e Alg e R162 correspondem respetivamente aos biocidas Algochene pronto ws e HMK R162. Na mesma tabela podemos observar as zonas de aplicação dos biocidas imediatamente após a aplicação dos biocidas, e 1 mês após. Na capela 2 e no pilar do convento optou se por não testar o Cloreto benzalcónico 50%, pois este teria uma coloração amarelada que estaria a manchar as áreas de estudo anteriormente testadas.

Tabela 10 - Zonas de aplicação dos biocidas, imediatamente após a aplicação e após 1 mês;
CB: Cloreto Benzalcónico 50%; Alg: Algochene pronto ws; R162: Hmk R162

Localização	Dia da aplicação			1 mês após a aplicação		
Hotel Pilar						
Hotel Escadas						
Parede Exterior Capela 1 Via sacra						



Pela observação da Tabela 10, consegue se perceber que no pilar exterior do Hotel, onde se encontra um fungo de coloração avermelhada, o Cloreto benzalcónico 50% foi o que conseguiu melhores resultados, sendo que nas outras áreas de estudo nesse mesmo pilar, já se conseguia perceber o crescimento de outro tipo de fungo, não de cor avermelhada, mas de um tom mais claro. Já nas escadas do hotel, o Cloreto benzalcónico 50% foi o que teve os piores resultados, passado 1 mês da sua aplicação, a área de estudo encontrava se coberta de filmes negros.

O biocida HMK R162 conseguiu uma limpeza mais visível dos filmes negros presentes neste mesmo local. No convento, como mencionado anteriormente só foi testado dois biocidas, o Algochene Pronto ws e o HMK R162, sendo que os dois tiveram resultados muito positivos, havendo uma limpeza total da alga *Chlorella Sp.* Na Capela 1 Via Sacra, todos os biocidas testados conseguiram uma eliminação microbiana bastante positiva, havendo melhoras significativas na coloração escura que apresentava, mas o que conseguiu uma maior limpeza foi o HMK R162.

É de salientar, que a parede interior da Capela 2 – Varanda de Pilatos, é a única área de teste que não se trata de pedra, mas sim revestimento de argamassa de cal aérea. O comportamento dos biocidas neste caso foi muito positivo, havendo uma limpeza total na área de aplicação dos biocidas.

Capítulo 7

Análise Multiespectral

7. ANÁLISE MULTIESPECTRAL

7.1. Enquadramento

No presente trabalho, recorreu-se à fotografia digital e processamento de imagem por poder representar uma vantagem na avaliação e prevenção do fenómeno da colonização biológica. Os bons resultados obtidos com análise multiespectral de imagem por Gonçalves et al. (2009) na avaliação do estado de conservação de edifícios, e por Lerma (2001;2005) na caracterização de fachadas de edifícios, e mais recentemente na inspeção de superfícies de betão à vista por Valença (2011) com resultados positivos, motivaram o estudo da aplicação da técnica na avaliação de eficácia da atuação de biocidas em superfícies pétreas, do Palácio Real, localizado na Mata Nacional do Buçaco.

7.2. Imagem Multiespectral

Os sistemas multiespectrais de imagem são mais utilizados na análise de obras de arte para mapear e identificar pigmentos e aglutinantes, bem como reintegrações cromáticas. É geralmente realizada com câmaras monocromáticas: um sensor CCD para a gama UV-VIS-NIR (próximo do infravermelho) (cerca de 360-1100 nm), e uma câmara InGaAs mais cara para a gama SWIR (infravermelho de onda curta) (900-1700 nm).

A câmara CCD permite observar as transições eletrónicas responsáveis, em parte, pela cor dos pigmentos, enquanto a câmara SWIR permite estudar as suas vibrações, que também são características (Cosentino, 2015).

Ambas as câmaras devem ser equipadas com um sistema de seleção de comprimento de onda apropriado, sendo a mais simples uma série de filtros de interferência *pass-band*. Este sistema captura imagens de um objeto numa série de bandas espectrais, que podem então ser utilizadas para reconstruir um espectro de reflectância para cada pixel da cena (Cosentino, 2015).

A partir do momento em que as imagens são registradas e calibradas, estas são carregadas no cubo da imagem da refletância, onde as imagens são representadas pelos eixos de X e de Y e a dimensão de Z denota o comprimento de onda da imagem. A partir do cubo, é então possível reconstruir o espectro de refletância de cada pixel (Cosentino, 2015).

Na espectroscopia de luz refletida, a propriedade fundamental que se quer obter é a refletância espectral: a relação entre energia refletida e energia incidente em função do comprimento de onda. Para a maioria dos materiais, a refletância varia com o comprimento de onda, porque a energia em certos comprimentos de onda é dispersa ou absorvida em diferentes graus.

A diferença entre sistemas multiespectrais ou hiperespectrais, depende do número de imagens espectrais produzidas; Menos de uma dúzia para o primeiro, e muito mais para os sistemas hiperespectral que podem usar filtros sintonizáveis (LCTF) ou filtro acústico-óptico sintonizável (AOTF), a fim de fornecer centenas de imagens espectrais (Cosentino, 2015). A possibilidade de utilizar uma câmara digital RGB em vez de uma monocromática, tem sido testada.

É necessário salientar que a imagem multiespectral também é referida no setor da conservação da arte como o método que consiste em adquirir uma coleção de imagens de banda espectral (imagens multimodais) realizadas com diferentes sensores e fontes de iluminação, como fotos de fluorescência ultravioleta, reflctogramas de infravermelhos e radiografias de raios-x (Cosentino, 2015)

Os sistemas de imagens multiespectrais e hiperespectrais têm sido aplicados para o estudo de arte, a fim de mapear e identificar materiais de artistas em pinturas (pigmentos e ligantes, como cola animal) para detetar danos e retoques. Também são usados para melhorar visualmente documentos antigos (Cosentino, 2015).

Foi demonstrado que, mesmo quando os pigmentos são misturados ou vidrados, o método pode fornecer uma identificação conclusiva, embora geralmente sejam recomendados exames analíticos micro-invasivos e não-invasivos para confirmar os resultados e fornecer informações mais detalhadas (Cosentino, 2015).

No entanto, a espectroscopia de imagem por reflexão pode auxiliar com sucesso na tomada de decisões de conservação e fornece informações importantes sobre os materiais presentes. Existe a necessidade no campo de conservação de arte de um sistema de imagens multiespectrais acessível para o mapeamento e a tentativa de identificação de pigmentos históricos em obras de arte (Cosentino, 2015).

Na última década, foram introduzidos sistemas que usavam poucas e grandes bandas espectrais, como o Artist. Estes sistemas não permitem reconstruir reflectância e são utilizados apenas para a inspeção qualitativa das imagens. Posteriormente, foram introduzidos sistemas caros que alcançam uma maior resolução e com filtros ótico de menor amplitude, como Sepia e Muis, fornecendo 70 e 34 bandas espectrais, respetivamente. Exemplo: Filtro 400nm: este filtro só deixa passar a luz neste comprimento de onda (400nm), no entanto também deixa passar alguma informação nos limites. Se tiver uma amplitude de 5nm, vai deixar passar alguma luz entre os 400nm \pm 5nm.

Outra solução é representada por um scanner que monta uma matriz fotomultiplicadora filtrada. Todos esses instrumentos, assim como muitos outros reconstróem o espectro de reflectância medindo a reflectância espectral diretamente em cada ponto do filtro. Outro método consiste em uma complexa reconstrução computacional dos espectros de reflectância a partir de vários filtros passa-alto. Esta abordagem foi desenvolvida para minimizar a radiação no alvo, uma vez que a aquisição é mais rápida, mas requer habilidades computacionais avançadas (Cosentino, 2015)

Geralmente, os filtros são escolhidos igualmente espaçados através do espectro registado. Vários estudos utilizam uma combinação de filtros de passagem estreitos e relativamente grandes. Mais filtros, como 18, permite maior resolução. Embora um grande número de filtros de menor amplitude proporcione uma resolução espectral mais elevada, implica também custos mais elevados e dificuldades mais técnicas na aquisição das imagens. Filtros de banda estreita precisam de iluminação de alta intensidade, uma condição que poderia ser proibitivo para objetos de arte sensíveis à luz, ou impraticável para grandes obras de arte.

7.2.1. Sistema XpeCAM X01

O equipamento utilizado no presente trabalho foi o XpeCAM X01 (Figura 31), em conjunto com o seu software. Com este equipamento pode se observar e adquirir imagens de um determinado objeto em 30 faixas do espectro distintas, desde 350nm e 1200nm. Os principais elementos deste sistema de imagem multiespectral incluem um sensor ótico, filtros, uma objetiva de 35mm e F1.4, e vários componentes eletrônicos. Neste sistema são utilizados 30 filtros bandpass. A Tabela 11 contém a lista de filtros disponibilizados, com o seu comprimento de onda associado, e largura de banda.

A câmara usada no sistema é uma câmara digital monocromática com um sensor CMOS incorporado. A resolução especial associada é de 5Mpixels, enquanto que a gama dinâmica aplicada é de 8bit. A sensibilidade do sensor varia dos 350nm aos 1200nm. Fazendo uso de um sistema de seleção de filtros, é possível explorar toda a gama do seu sensor e, em alguns casos levá-los aos seus valores limite.

Após a aquisição das imagens, estas são armazenadas para uma posterior análise, esta que é realizada pela Xpectraltek, e consiste na normalização de luz e o registo de imagens.



Figura 31 - Equipamento XpeCam X01;

Tabela 11 – Lista de filtros do sistema XpeCAM x01 e respectivos comprimentos de onda e largura de banda;

Comprimento de onda	Largura de banda	Comprimento de onda	Largura de banda
UV		Infravermelhos	
350	10	750	25
360	10	800	25
370	10	850	25
380	10	900	25
390	10	950	25
Visível		1000	25
400	25	1050	25
425	25	1100	25
450	25	1150	25
475	25	1200	25
500	25	Outros	
525	25	400-700	300
550	25	350-400	50
575	25		
600	25		
625	25		
650	25		
675	25		
700	25		

7.2.2. Leitura espectral nas placas de fungos

7.2.2.1. Metodologia laboratorial

Os fungos obtidos a partir da amostra recolhida do pilar foram inoculados em placas de Petri (4 por isolado) contendo meio PDA e incubados a aproximadamente 23°C durante 15 dias. Findo este período foram aplicados os Biocidas (HMK R162, Algochene pronto Ws e o Cloreto benzalcónico 50%), 1 mL por placa (sem aplicação de biocida). Os biocidas estiveram a atuar nos fungos inoculados nas placas de Petri, cerca de 30 dias, antes de se fazer as leituras espectrais nas mesmas.

De 4 placas com o mesmo fungo, uma placa não irá levar biocida, para se poder obter imagens multiespectrais do fungo vivo, as outras 3 placas irão sofrer a atuação dos biocidas

HMK R162, Algochene pronto Ws e Cloreto Benzalcónico 50% para se poder observar atuação destes biocidas através da imagem multiespectral. É de salientar que a aplicação foi feita individualmente, ou seja o Biocida HMK R162 irá atuar na placa 1, o Algochene Pronto ws irá atuar na placa 2 e o biocida Cloreto benzalcónico 50% irá atuar na placa 3. Para melhor compreensão desta metodologia, de seguida encontra se a Tabela 12, com todas as imagens das placas.

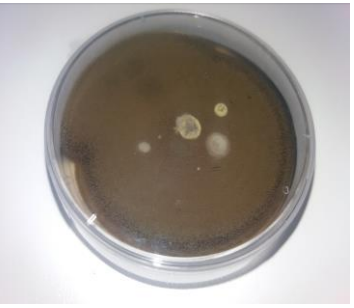











A identificação dos fungos foi feita recorrendo a uma abordagem genética. Isto é, foi determinada a sequência de ADN de uma região do genoma que permite determinar qual a espécie.

Caracterização dos fungos:

- Fungo 1 – *Cladosporium cladosporioides*
- Fungo 2 – *Epicoccum nigrum*
- Fungo 3 - *Cladosporium* Sp.

O Fungo 3 aparece como *Cladosporium* Sp. porque não se conseguiu determinar exatamente qual a espécie. A identificação foi feita apenas ao nível do género.

Tabela 12 - Placas Petri com 3 fungos diferentes sujeitas à atuação de 3 biocidas diferentes;

	Fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i>	Fungo 2 - <i>Epicoccum nigrum</i>	Fungo 3 - <i>Cladosporium</i> sp.
Sem biocida			
HMK R162			
Algochene pronto			
Cloreto Benzalcónico			

7.2.2.2. Obtenção e Interpretação de resultados

Após a obtenção das imagens multiespectrais das placas de Petri, foram selecionados 8 pontos em cada placa (Figura 32a) e b)) e para o intervalo de 500nm e 1000nm de comprimento de onda, foram obtidos os resultados das leituras espectrais, e com base nos mesmos, fornecidos pela empresa Xpectraltek, foi efetuada uma análise correlacional entre as placas com o fungo ativo/vivo, sem qualquer atuação de biocida, e com as placas com o mesmo fungo, mas sujeita à atuação dos biocidas em estudo.

Se a correlação entre uma placa com um determinado fungo vivo, e uma placa com esse mesmo fungo, mas sujeito à atuação de um determinado biocida for elevada, supõe-se que a atuação do biocida em questão não foi positivo, assim como, se a correlação for baixa a atuação do biocida foi positiva, ou seja surtiu o efeito desejado, a eliminação do fungo.

Sendo assim, analisando as Tabelas 13, 14 e 15, as correlações são demasiado elevadas para o fungo 1 e 2, em relação à atuação dos 3 biocidas. A placa com o fungo 3 é o que apresenta menores correlações, indicando uma elevada atuação dos biocidas neste mesmo fungo.

O fungo 3 foi quem sofreu mais efeito à atuação dos biocidas, mas em termos generalizados, o biocida Cloreto Benzalcônico foi quem apresentou melhores resultados, nesta experiência.

Estes resultados levam a especular que o fungo 3 é o mais suscetível à atuação de biocidas, e o fungo 2 e 3 são mais resistentes, e sendo assim mais difíceis de serem eliminados, ou por outro lado, estes biocidas, podem não ser os mais indicados para a exterminação destes mesmos organismos.

Os dados espectrais fornecidos pela empresa Xpektraltek, estudados para chegar aos valores apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15 encontram se no Anexo V.

Tabela 13 - Correlações entre as placas de Petri com o fungo 1 Ativo/vivo e as placas do fungo 1 sujeitas à atuação dos biocidas: HMK R162 Cloreto Benzalcónico 50%e Algochene.

Correlações entre placas de Petri do Fungo 1:		
Placa com fungo 1 ativo e placa com fungo 1 com atuação do biocida HMK R162	Placa com fungo 1 ativo e placa com fungo 1 com atuação do biocida Cloreto Benzalcónico 50%	Placa com fungo 1 ativo e placa com fungo 1 com atuação do biocida Algochene
0,65	0,74	0,70

Tabela 14 - Correlações entre as placas de Petri com o fungo 2 ativo/vivo e as placas do fungo 2 sujeitas à atuação dos biocidas: HMK R162, Cloreto Benzalcónico e Algochene.

Correlações entre placas de Petri do Fungo 2:		
Placa com fungo 2 ativo e placa com fungo 2 com atuação do biocida HMK R162	Placa com fungo 2 ativo e placa com fungo 2 com atuação do biocida Cloreto Benzalcónico 50%	Placa com fungo 2 ativo e placa com fungo 2 com atuação do biocida Algochene
0,85	0,62	0,82

Tabela 15- Correlações entre as placas de Petri com o fungo 3 ativo/vivo e as placas do fungo 3 sujeitas à atuação dos biocidas: HMK R162, Cloreto Benzalcónico 50% e Algochene.

Correlações entre placas de Petri do Fungo 3:		
Placa com fungo 3 ativo e placa com fungo 3 com atuação do biocida HMK R162	Placa com fungo 3 ativo e placa com fungo 3 com atuação do biocida Cloreto Benzalcônico 50%	Placa com fungo 3 ativo e placa com fungo 3 com atuação do biocida Algochene Pronto ws
0,19	0,08	0,08

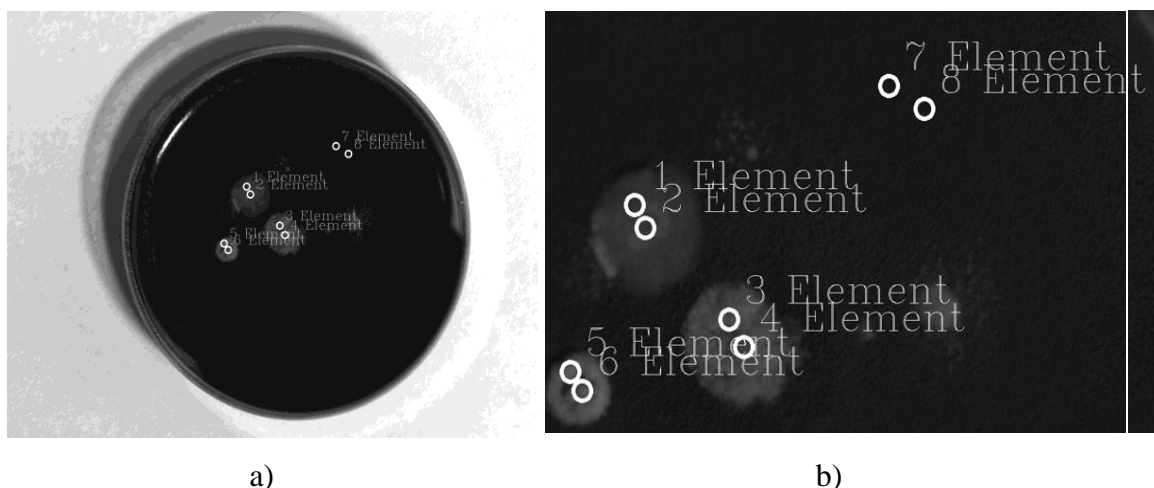


Figura 32 - a) Placa com o fungo 1; b) Pormenor da seleção dos pontos da placa com o fungo 1.

7.2.3. Leitura espectral nas amostras de Rocha dolomítica

7.2.3.1. Metodologia laboratorial

Esta experiência consistiu na suspensão de esporos do fungo *Cladosporium* Sp. (retirado do pilar do Hotel Palácio) em amostras de rochas dolomíticas, por ser a rocha utilizada na construção do Hotel Palácio, o edifício em estudo.

O processo consistiu em raspar o micélio do fungo 3 *Cladosporium* Sp. (Figura 33a)) com uma ansa de inoculação, e colocar estas raspagens em 50 mL de solução de água destilada estéril. (Figura 33b)). Com o auxílio do Vortex, misturou-se o micélio com a água (Figura 33c)), e de seguida coloca-se 3,5 mL dessa mistura em cada rocha dolomítica, que se encontravam previamente húmidas (Figura 34).

As rochas estiveram a ser colonizadas durante 3 meses, após esse período foi aplicado os biocidas. A leitura espectral foi realizada passado 2 dias da aplicação dos biocidas.

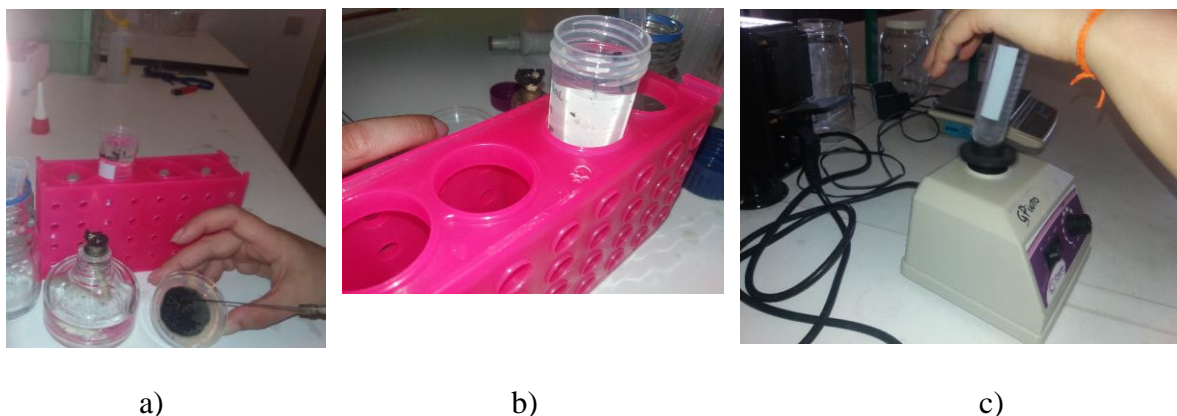


Figura 33 - a) Raspagem dos micélios do fungo *Cladosporium* Sp. ; b) Água destilada estéril com os esporos; c) Mistura dos esporos do fungo com a água destilada estéril com o auxílio do Vortex;



a) b) c)
Figura 34 - Metodologia do processo de colonização das rochas dolomíticas;

7.2.3.1. Obtenção e Interpretação de resultados

Após a obtenção das imagens multiespectrais das rochas dolomíticas, foram selecionados 8 pontos em cada rocha, nas zonas onde era mais perceptível a presença do fungo *Cladosporium* Sp. Como seria de esperar a colonização não foi elevada, para haver um crescimento significativo do fungo, o período de colonização teria que ser bastante mais extenso, por se tratar de uma rocha com um nível de porosidade não elevada (Figura 34a) e b)). Mas já era possível observar pequenas concentrações de fungo em todas as rochas.

Para o intervalo de 500nm e 1000nm de comprimentos de onda, foram obtidos os resultados das leituras espectrais, e com base nos mesmos, fornecidos pela empresa Xpectraltek, foi efetuada uma análise correlacional entre rocha com o fungo ativo/vivo, sem qualquer atuação de biocida, e com as rochas com o mesmo fungo, mas sujeita à atuação dos biocidas em estudo.

Se a correlação entre a rocha com o fungo vivo, e a rocha com o mesmo fungo, mas sujeito à performance de um determinado biocida for elevada, supõe-se que a atuação do biocida em questão não foi positivo, assim como, se a correlação for baixa a atuação do biocida foi positiva, ou seja surtiu o efeito desejado, a eliminação do fungo.

Nas figuras 35, 36, 37 e 38 é possível observar imagens espectrais obtidas, já com a seleção dos pontos a analisar.

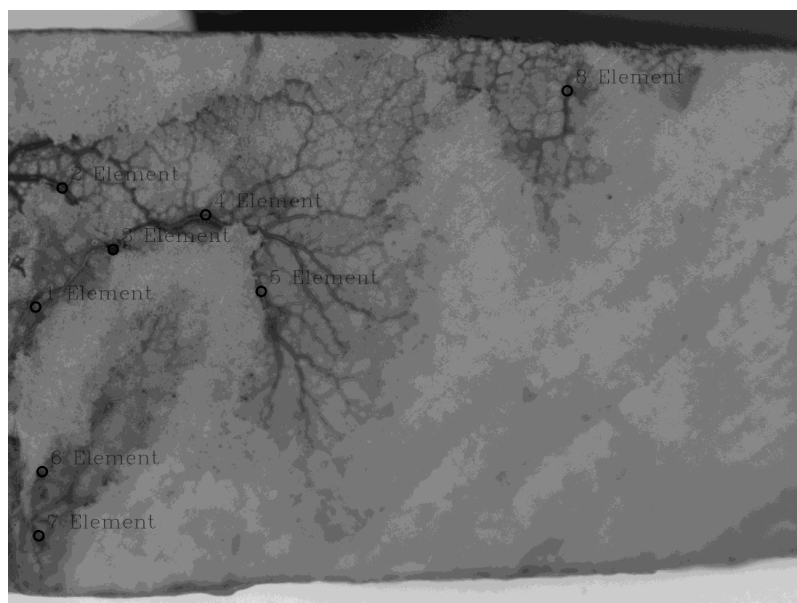


Figura 35 – Imagem multiespectral da rocha dolomítica sem colonização do fungo;



Figura 36 – Imagem multiespectral da rocha dolomítica com a aplicação do biocida HMK R162K;



Figura 37 - Imagem multiespectral da rocha dolomítica com a aplicação do biocida Cloreto benzalcônico 50%;

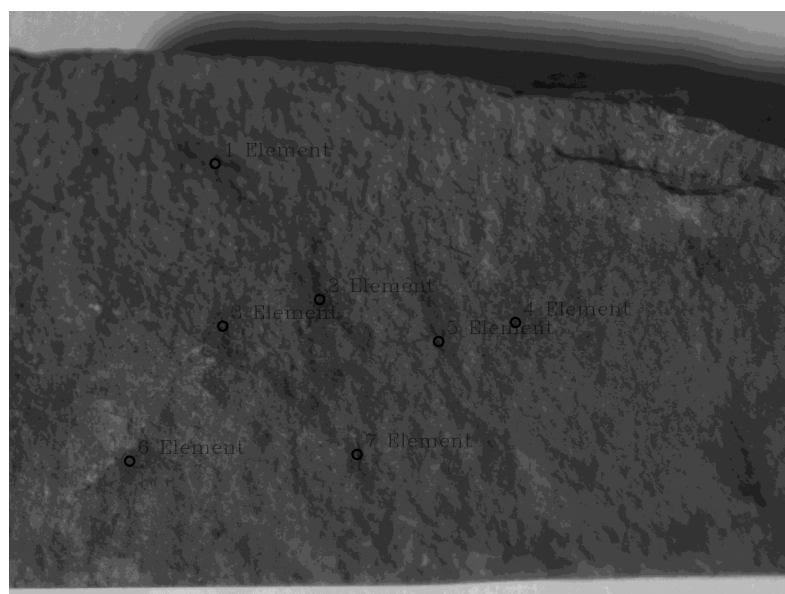


Figura 38 - Imagem multiespectral da rocha dolomítica com a aplicação do biocida Algochene pronto ws;

Sendo assim, analisando a Tabela 16, as correlações realizadas entre a rocha com o fungo ativo com a rocha com aplicação do biocida HMK R162, e com a rocha com aplicação do biocida Cloreto Benzalcónico 50% são bastante elevadas, sendo a correlação mais baixa a da rocha com Algochene Pronto Ws.

Visivelmente as rochas que tinham sido sujeitas à performance dos biocidas apresentavam pequenas zonas mais escuras, mas de pequena dimensão. Essas pequenas zonas eram a manifestação do fungo pois todas elas tinham uma tez branca, antes da colonização biológica.

Os dados espectrais fornecidos pela empresa Xpektraltek, estudados para chegar aos valores apresentados na Tabela 16, encontram-se no Anexo VI.

Tabela 16 - Correlações efetuadas entre os dados obtidos das rochas dolomíticas com e sem atuação dos biocidas em estudo.

Correlações entre:		
Rocha sem aplicação com rocha com aplicação do biocida HMK R162	Rocha sem aplicação com aplicação do biocida Cloreto benzalcónico 50%	Rocha sem aplicação com aplicação do biocida Algochene Pronto ws
0,70	0,92	0,11

Capítulo 8

Conclusão

8. CONCLUSÃO

A presente dissertação teve como objetivo principal estudar formas de avaliar a atuação e eficácia de biocidas no contexto da conservação do património edificado. O objetivo secundário do trabalho efetuado relaciona-se com a avaliação da possibilidade de utilização de técnicas de avaliação e análise desta eficácia, com incidência na análise multiespectral.

A primeira fase do trabalho consistiu na identificação visual das espécies existentes nos edifícios da Mata Nacional do Buçaco, e extração de amostras de organismos para isolamento e meios de cultura, para a realização de testes aos três biocidas em estudo, tanto *in situ* como laboratorialmente. A seleção de três biocidas foi efetuada tendo em consideração substrato onde se iria aplicar.

A segunda fase consistiu na aplicação *in situ* que foi realizada em cinco zonas, num pilar (parte superior) e nas escadas do Palácio Hotel, na parede exterior de uma das capelas da Via Sacra, na parede interior na Varanda de Pilatos, e num pilar do Convento.

As áreas de estudo em exterior incidiram sobre paredes em pedra e paredes revestidas com argamassa. A atuação dos três biocidas na parede interior teve os melhores resultados, havendo uma limpeza total na área de aplicação dos biocidas. Aqui o tipo de colonização biológica presente é predominantemente a alga designada *Chlorella sp.* É de salientar que a visualização da performance dos biocidas em todas as áreas de aplicação foi feita um mês após a aplicação.

Na parte superior do pilar no Hotel Palácio, encontrava-se presente uma espécie de líquene de cor avermelhada, que não se conseguiu identificar, e aqui a atuação do biocida Cloreto Benzalcónico 50% foi o que obteve os melhores resultados, sendo que nas outras áreas de aplicação já era visível o crescimento de outro tipo de fungo de tom mais claro.

Nas escadas do Hotel Palácio, ao contrário do que se constatou no pilar do Hotel, o Cloreto Benzalcónico obteve os piores resultados, sendo o biocida HMK R162K o que mais se destacou positivamente. Neste local, o tipo de colonização biológica existente é predominantemente filmes negros.

No convento, só foram testados dois biocidas, o Algochene Pronto ws e o HMK R162, sendo que os dois tiveram resultados muito positivos, havendo uma limpeza total da alga *Chlorella sp.*

Na Capela 1 Via Sacra, todos os biocidas testados conseguiram uma eliminação microbiana bastante positiva, havendo melhoras significativas na coloração escura que apresentava, mas o que conseguiu uma maior limpeza foi o HMK R162.

Concluindo, em termos de aplicação direta nas áreas selecionadas:

- o HMK R162 apresentou resultados positivos na eliminação de filmes negros, e da alga *Chlorella sp.*
- o Cloreto Benzalcónico 50% apresentou bons resultados na eliminação de líquenes, e mostrou-se ser um mau produto para a eliminação de filmes negros (em fachadas de rocha).
- o Algochene Pronto Ws, obteve resultados positivos em filmes negros, sendo que em argamassa, juntamente com os outros 3 biocidas, eliminou por completo a alga *Chlorella Sp.*

A terceira fase do trabalho foi realizada laboratorialmente. Das amostras retiradas da superfície da rocha dos objetos de estudo, foi possível cultivar uma variedade de microrganismos. Para a avaliação da eficácia dos diferentes biocidas foi usado o método de Kirby-Bauer (método de difusão em disco), utilizaram-se pequenos discos de papel absorvente, embebidos no biocida a testar, para haver uma comparação entre halos de inibição.

A comparação entre os halos de inibição nos isolados bacterinos é bastante clara, em termos médios o Algochene tem um efeito superior ao do Cloreto benzalcónico 50%. O biocida HMK R162 foi o que apresentou os piores resultados.

Ao contrário do que se passou nos isolados bacterinos, o Algochene teve os piores resultados nos isolados fúngicos, não existindo em muitas placas halos de inibição. O Cloreto Benzalcónico foi o biocida com a melhor atuação nos fungos, sendo que em quase todas as placas teve os maiores diâmetros dos halos de inibição.

A última fase do trabalho, foi a avaliação da aplicabilidade da análise multiespectral para avaliação da eficiência de atuação de biocidas. Para tal, foram realizadas duas experiências, sendo feitas leituras espectrais em placas de Petri e em amostras de rocha dolomítica, por ser a existente no Hotel Palácio. Com base em dados espectrais, e em testes correlativos entre fungos mortos e vivos tanto em placas de Petri como em amostras de rocha dolomítica, conseguiu-se chegar a valores que podem levar a crer quando a atuação do biocida é positiva ou negativa na eliminação de determinado fungo (no caso do presente trabalho, os testes foram feitos com os fungos: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium Sp*, *Epicoccum nigrum*, retirados do pilar do Hotel Palácio).

Seria interessante a continuação do presente trabalho, com a utilização de outros biocidas (mais recentemente lançados e com características diferentes dos utilizados neste estudo) e que atuassem em uma gama de fungos maior e diversificada, que habitualmete se encontram na colonização de fachadas de edificios. O tempo de atuação dos biocidas poderia ser maior, como meio ano, 1 ano, ou até mesmo 2 anos para se tentar perceber se a performance dos biocidas em determinado fungo perdura ao longo do tempo. O estudo da aplicabilidade da imagem multiespectral na avaliação da actuação de biocidas em fachadas de edificios, poderia ser bastante melhorado, pois existiriam mais dados de comparação, sugerindo-se que a leitura espectral seja efectuada *in situ*, para que os resultados sejam o mais próximos da realidade possível, conjuntamente com a isolamento de fungos em placas de Petri.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELHO. (2013). *Protocolos de microbiologia ambiental, Parte 1 – Métodos básicos em microbiologia*

BARTOLINI, M., RICCI, S., DEL SIGNORE, G., (2004). *Release of photosynthetic pigments form epilithic biocenosis after biocide treatments*. Proceedings of the 10th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone; 27 June- 2 July 2004; Stockholm ICOMOS; p 519-526

BEYDOUN, D., AMAL, R., LOW, G., MCEVOY, S., (1999). *The role of nanoparticles on photocatalysis*. Journal of Nanoparticle Research. 439-458.

CANEVA, G.; NUGARI, M. P., (1991) *Biology in the conservation of Works of art*. ICCROM, Roma.

CANEVA, G.; NUGARI, M.P.; PINNA, D.; SALVADORI, O., (1996). *Il Controllo del degrado biológico – i biocidi nel restauro dei materiali lapidei*. Nardini Editore: Fiesole

CARTRO, A. M. (1896). *Guia histórico do viajante no Bussaco*. Coimbra: Impresa da Universidade.

CHEN, J., POON, C.,(2009). *Photocatalytic construction and building materials: From fundamentals to applications*. Building and Environment 44, 1899-1906.

COSENTINO. (2015). *Multispectral imaging system using 12 interference filters for mapping pigments*. Cultural Heritage Science Open Source, Piazza Cantarella 11, Aci Sant`Antonio 95025, Italy.

COUTINHO. (2015). *Biological colonization on majolica glazed tiles: biodeterioration, bioreceptivity and mitigation strategies*. Tese de doutoramento em Conservação e Restauro. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

COOKE, M., (2002). European review of biocides. PharmaChem 48–50.

CRISPIM, C. A., GAYLARDE, C. C.(2005). *Cyanobacteria Biodeterioration of Cultural heritage : a review*. Microbial Ecology 49, 1-9.

DE LOS RIOS, A., PÉREZ-ORTEGA, S., WIERZCHOS, J., ASCASO, C.,(2012). *Differential effects of biocide treatments on saxicolous communities: Case study of the Segovia cathedral cloister (Spain)*. Int. Biodeterior. Biodegradation 67, 64–72

LOPES. (2012). *Flora e Vegetação da Mata Climácica do Buçaco*. Tese de mestrado em Biologia. Universidade de Aveiro.

- DINA M.R.MATEUS; RENATA B. SILVA; FERNANDO M. C. COSTA; JOÃO P. F. COROADO; (2013). *Diversidade microbiológica do edifício da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e avaliação do seu controlo por biocidas*.
- FERREIRA. (2014). *Caracterização de materiais construtivos dos edifícios do Buçaco*. Tese de mestrado em Engenharia Civil. Universidade de Aveiro.
- FONSECA. (2009). *Avaliação da eficácia de tratamentos convencionais e aplicações alternativas para prevenir a biodeterioração do património cultural*. Tese de mestrado em Conservação e Restauro. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Fundação da Mata do Bussaco. (2012). Obtido de <http://www.fmb.pt/>
- GAYLARDE, C., RIBAS SILVA, M., WARSCHIED, TH., (2003). *Microbial impact on building materials: an overview*. Materials and Structures 36, 342-352.
- K. QI., X. CHEN, Y. LIU, J. XIN, C. L. MAK, W. Journal of Materials Chemistry, 17 (2007) 3504-3508.
- GOMES, P. V. (2005). Buçaco, o deserto do Carmelitas Descalços. Coimbra: XM.
- NUGARI, M. P.; SALVADORI, O., (2003). *Biodeterioration control of cultural heritage: Methods and products*, Swets & Zeitlinger, Lisse
- PEREIRA. (2001). *Comparação da eficácia de dois biocidas(carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. Tese de doutoramento em Engenharia Química e Biológica. Universidade do minho, Braga.
- PEREIRA. (2014). *Caracterização de materiais construtivos dos edifícios do Buçaco*. Tese de mestrado em Engenharia Civil. Universidade de Aveiro.
- Rivas-Martínez S. (1996). Geobotánica y Climatología. Universidade de Granada
- Rivas-Martínez S., & Loidi Arregui J. (1999). Bioclimatology of the Iberian Peninsula. Itinera Geobotanica 13.
- Rivas-Martínez S., Penas S. A. & Díaz T.E. (2004). Bioclimatic Map of Europe, Bioclimates. Cartographic Service. University of León, Spain
(Disponível em: http://www.globalbioclimatics.org/form/tb_map/MS30W180.htm)
- Rivas-Martínez S., Penas S. A. & Díaz T.E. (2004). Bioclimatic Map of Europe, Thermoclimatic Belts. Cartographic Service. University of León, Spain
(Disponível em: http://www.globalbioclimatics.org/form/tb_map/MS30W180.htm)
- Rivas-Martínez S., Penas S. A. & Díaz T.E. (2004). Biogeographic Map of Europe. Cartographic Service. University of León, Spain

(Disponível em: http://www.globalbioclimatics.org/form/bg_map/index.htm)

Rivas-Martínez, S., Fernández-González, F., Loidi, J., Lousã, M. & Penas, A. (2001).

Syntaxonomical checklist of vascular plant communities of Spain and Portugal to association level. *Itinera Geobotanica* 14: 5-341 (Disponível em:

http://www.globalbioclimatics.org/book/checklist/checklist_c_01.htm)

RUSSEL, A. D, and CHOPRA, I., (1990). *Understanding antibacterial action and resistance*. Horwood Ltd. Chichester.

SAIZ-JIMENEZ. C., (1991). *Biogeochemistry of Weathering Processes in Monuments*. *Geomicrobiol J* 16, 27-37.

SUNADA, K., WATANABE, T., HASHIMOTO, K., (2003). *Bactericidal Activity of Copper Deposit TiO₂ thin film under weak UV illumination*. *Environmental Science Technology* 37,4785-4789.

TIANO, P., (1998). *Biodeterioration of Cultural Heritage*. *Sci Tech Cult Herit* 7, 19-38.

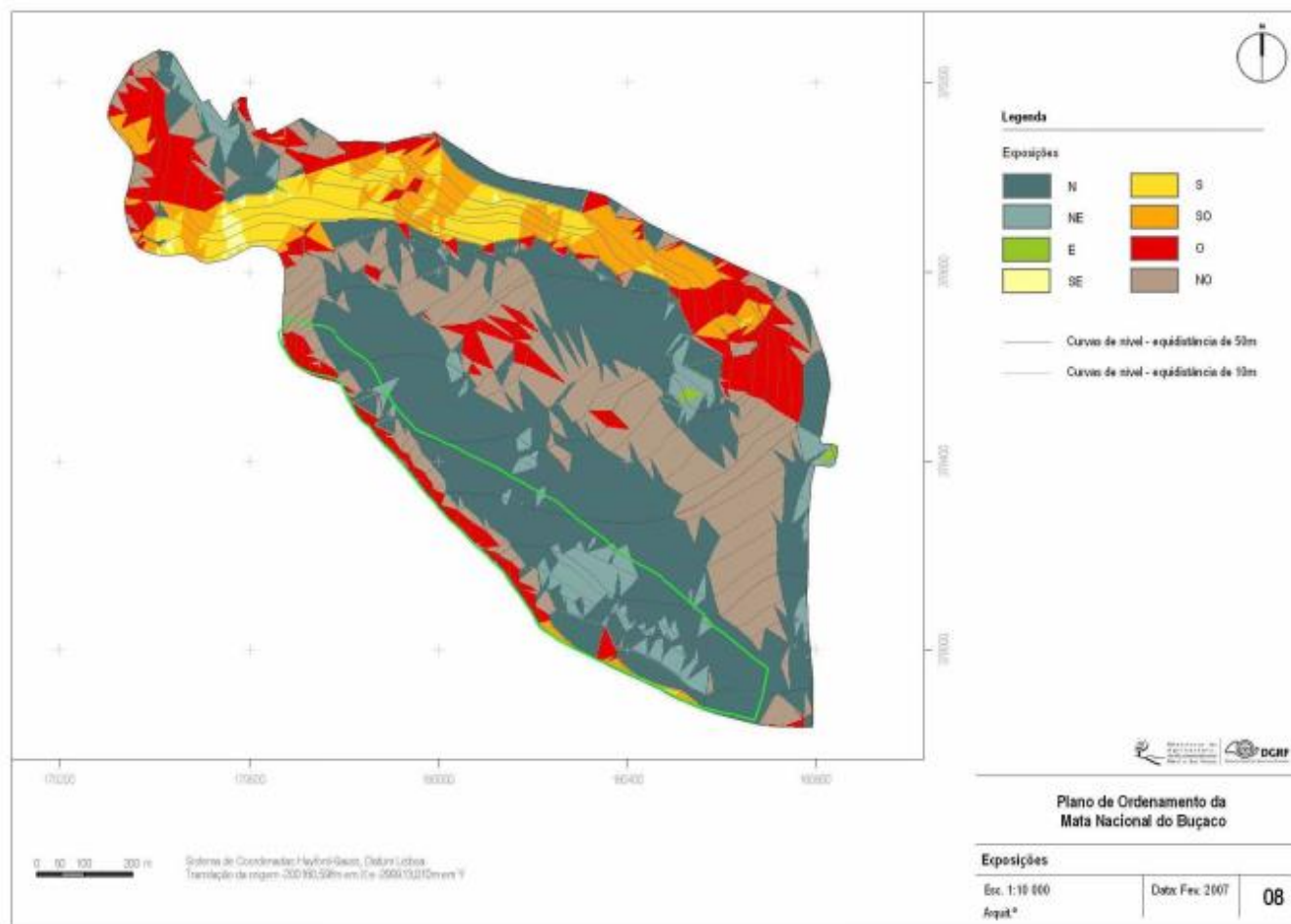
LNEG. (2010). *Carta Geológica de Portugal*.

LOPES. (2012). *Flora e Vegetação da Mata Climática do Buçaco*. Tese de mestrado em Biologia pela Universidade de Aveiro.

Anexos

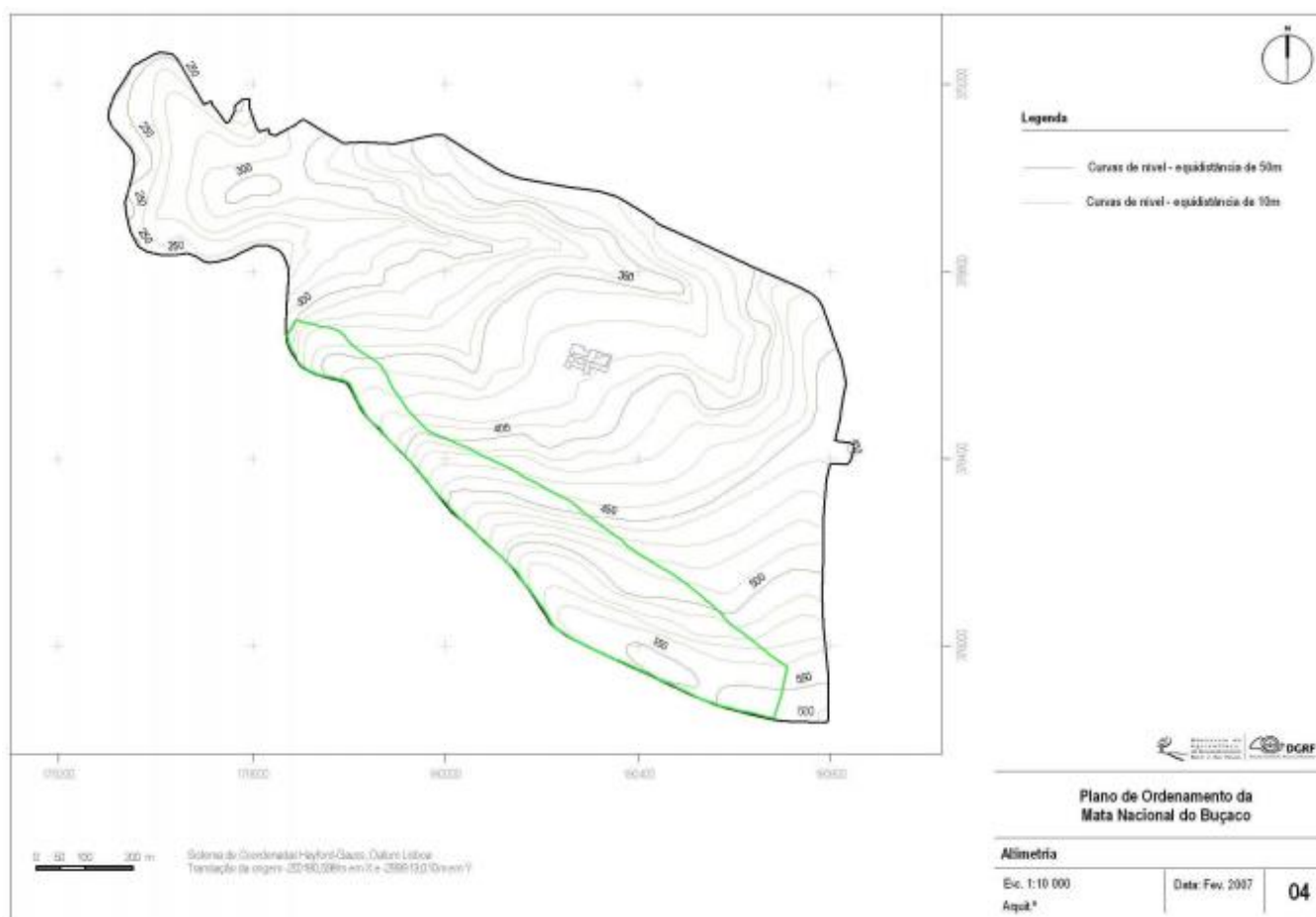
Anexo I

Figura 39 – A. I. - Carta de Exposições da MNB com a localização da Mata Climática, delimitada a verde. (Adapt. do POG da MNB, 2009).



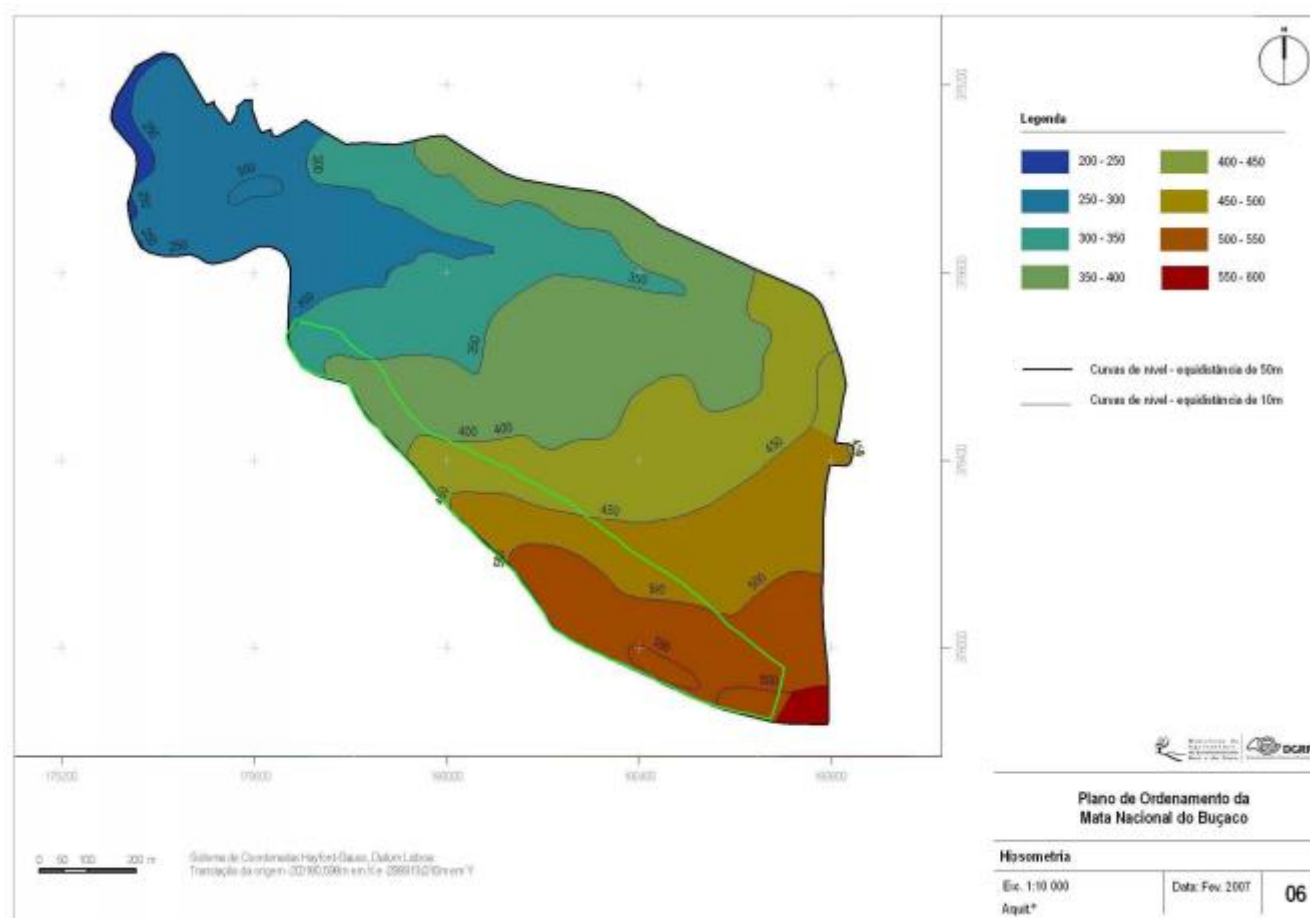
Anexo II

Figura 40 – A. II - Carta de **Altimetria** da MNB com a localização da Mata Climácica, delimitada a verde. (Adapt. do POG da MNB, 2009).



Anexo III

Figura 41 – A.III. Carta Hipsométrica da MNB com a localização da Mata Climácica, delimitada a verde. (Adapt. do POG da MNB, 2009)



Anexo IV

(Placas de Petri – Halos de Inibição)

Placas de Petri - Halos de Inibição

Tabela 17 – A.IV. Placas de Petri com os isolados bacterianos com os halos de inibição de cada um dos biocidas: HMK R162, Algochene pronto ws e Cloreto benzalcônico 50%;

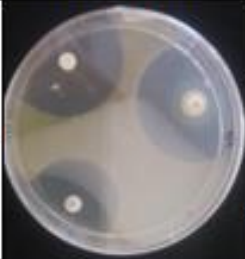
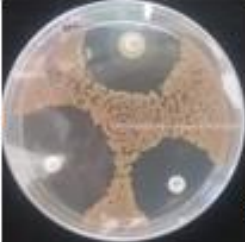
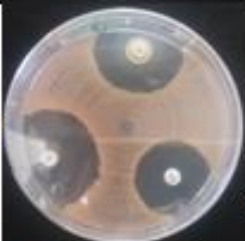

Isolados Bacterianos			
	Placas de Petri	Biocidas	Halos de Inibição (cm)
B1		HMK R162	1,5
		Algochene pronto ws	1,7
		Cloreto benzalcônico 50%	2,0
B2		HMK R162	1,4
		Algochene pronto ws	2,0
		Cloreto benzalcônico 50%	1,5
B3		HMK R162	1,0
		Algochene pronto ws	1,2
		Cloreto benzalcônico 50%	1,4
B5		HMK R162	1,5
		Algochene pronto ws	1,3
		Cloreto benzalcônico 50%	2,0

Tabela 18 – A.IV. Placas de Petri com os isolados fúngicos com os halos de inibição de cada um dos biocidas: HMK R162, Algochene pronto ws e Cloreto benzalcônico 50%;







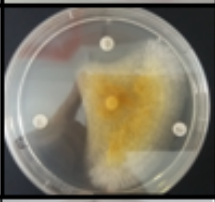

Isolados Fúngicos			
	Placas de Petri	Biocidas	Halos de Inibição (cm)
F1		HMK R162	0,8
		Algochene pronto ws	0,0
		Cloreto benzalcônico 50%	1,5
F2		HMK R162	0,3
		Algochene pronto ws	0,0
		Cloreto benzalcônico 50%	1,1
F3		HMK R162	0,7
		Algochene pronto ws	0,0
		Cloreto benzalcônico 50%	1,7
F4		HMK R162	1,2
		Algochene pronto ws	0,3
		Cloreto benzalcônico 50%	1,2

Tabela 19 – A.IV. Placas de Petri com os isolados fúngicos (Cont.) com os halos de inibição de cada um dos biocidas: HMK R162, Algochene pronto ws e Cloreto benzalcônico 50%;

Isolados Fúngicos (Cont.)			
	Placas de petri	Biocidas	Halos de Inibição (cm)
F5		HMK R162	0,5
		Algochene pronto ws	0,2
		Cloreto benzalcônico 50%	1,3
F6		HMK R162	0,4
		Algochene pronto ws	0,0
		Cloreto benzalcônico 50%	1,6
F7		HMK R162	0,5
		Algochene pronto ws	0,5
		Cloreto benzalcônico 50%	1,5
F8		HMK R162	0,5
		Algochene pronto ws	1,3
		Cloreto benzalcônico 50%	0,6

Anexo V

(Dados espectrais – Placas de Petri)

- Fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* sem aplicação de biocidas, e correspondente seleção de pontos (Elements):

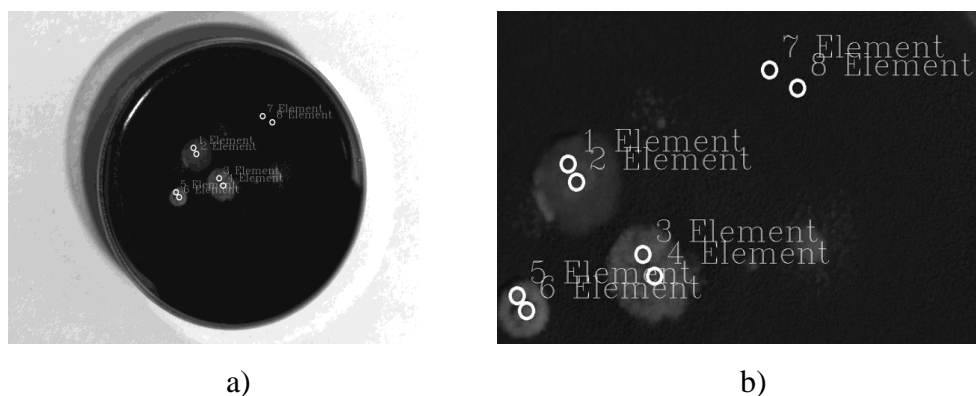


Figura 42 – A.V. a) Placa com o fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* sem aplicação de biocidas; b) Pormenor da seleção dos pontos da placa com o fungo 1;

Tabela 20 – A.V. Dados espectrais do fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* sem atuação de biocidas;

Dados espectrais da placa de Petri com o fungo 1 sem atuação de biocidas									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,19	0,21	0,28	0,23	0,34	0,32	0,09	0,09	0,22
0525 nm	0,2	0,21	0,32	0,24	0,37	0,33	0,1	0,1	0,23
0550 nm	0,16	0,17	0,25	0,19	0,28	0,25	0,09	0,08	0,18
0575 nm	0,22	0,24	0,37	0,27	0,41	0,36	0,12	0,13	0,26
0600 nm	0,19	0,21	0,32	0,23	0,34	0,3	0,12	0,12	0,22
0625 nm	0,22	0,24	0,37	0,27	0,39	0,34	0,14	0,14	0,26
0650 nm	0,19	0,21	0,32	0,23	0,34	0,3	0,13	0,13	0,22
0675 nm	0,19	0,21	0,31	0,23	0,33	0,29	0,13	0,13	0,22
0700 nm	0,2	0,23	0,33	0,24	0,35	0,3	0,14	0,14	0,24
0750 nm	0,21	0,24	0,32	0,24	0,33	0,29	0,15	0,15	0,24
0800 nm	0,19	0,23	0,29	0,22	0,31	0,27	0,14	0,15	0,23
0850 nm	0,28	0,33	0,41	0,32	0,44	0,39	0,2	0,21	0,33
0900 nm	0,28	0,34	0,42	0,32	0,43	0,38	0,21	0,22	0,33
0950 nm	0,26	0,32	0,38	0,3	0,4	0,35	0,21	0,21	0,31
1000 nm	0,25	0,3	0,36	0,29	0,37	0,33	0,21	0,21	0,30

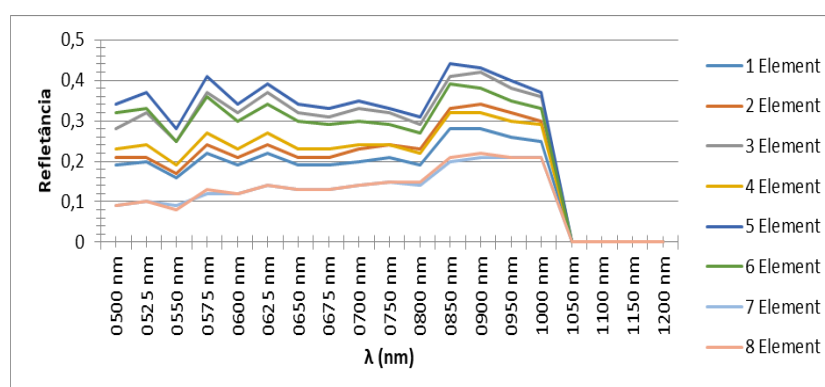


Figura 43 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* sem aplicação de biocidas;

- Fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* com a aplicação do biocida HMK R162, e seleção de pontos(Elements):

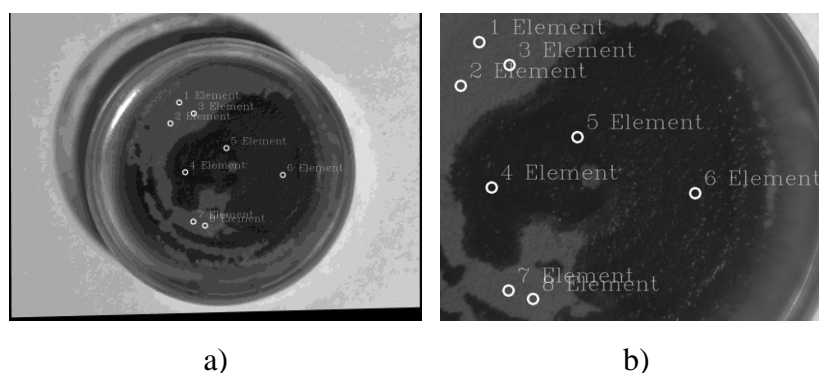


Figura 44 – A.V. a) Placa com o fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* com a aplicação do biocida 1 HMK R162; b) Pormenor da seleção dos pontos;

Tabela 21 – A.V.Dados espectrais do fungo 1- *Cladosporium cladosporioides* com actuação do biocida HMK R162;

Fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> com atuação do biocida HMK R162K										
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média pontos fungo ativo/vivo	Média pontos fungo ativo/morto
0500 nm	0,08	0,08	0,08	0,04	0,03	0,04	0,08	0,08	0,08	0,04
0525 nm	0,09	0,09	0,08	0,03	0,03	0,05	0,08	0,09	0,09	0,03
0550 nm	0,13	0,13	0,13	0,06	0,05	0,08	0,13	0,13	0,13	0,06
0575 nm	0,13	0,13	0,12	0,05	0,04	0,05	0,13	0,13	0,13	0,05
0600 nm	0,14	0,14	0,14	0,06	0,06	0,06	0,14	0,14	0,14	0,06
0625 nm	0,13	0,14	0,13	0,06	0,05	0,06	0,14	0,14	0,14	0,06
0650 nm	0,12	0,14	0,12	0,05	0,05	0,05	0,12	0,12	0,12	0,05
0675 nm	0,16	0,14	0,15	0,06	0,06	0,06	0,16	0,16	0,16	0,06
0700 nm	0,17	0,14	0,17	0,06	0,06	0,07	0,17	0,18	0,17	0,06
0750 nm	0,18	0,14	0,18	0,07	0,07	0,07	0,18	0,18	0,18	0,07
0800 nm	0,17	0,14	0,17	0,06	0,06	0,07	0,18	0,18	0,17	0,06
0850 nm	0,21	0,14	0,22	0,08	0,08	0,09	0,22	0,23	0,22	0,08
0900 nm	0,2	0,14	0,21	0,08	0,08	0,09	0,21	0,22	0,21	0,08
0950 nm	0,2	0,14	0,21	0,08	0,08	0,09	0,21	0,22	0,21	0,08
1000 nm	0,28	0,14	0,29	0,12	0,12	0,14	0,3	0,31	0,29	0,12

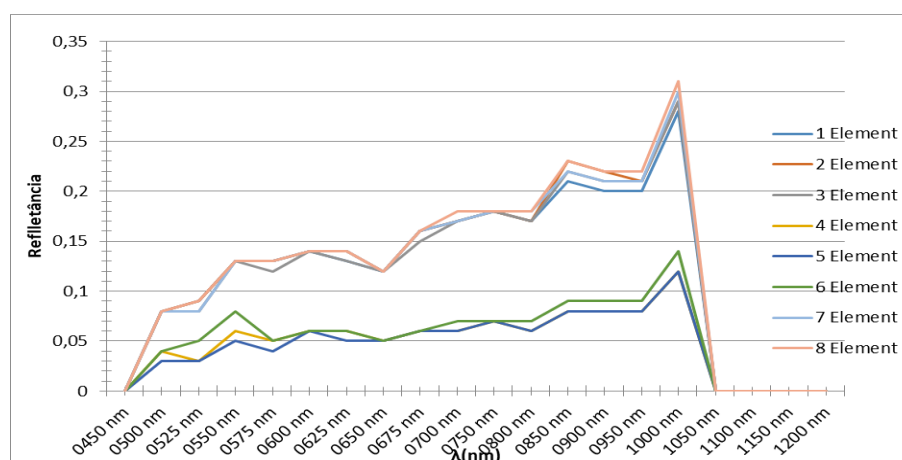


Figura 45 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa fungo 1- *Cladosporium cladosporioides* com aplicação de biocida 1 HMK R162;

- Fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* com a aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws, e seleção de pontos (Elements):

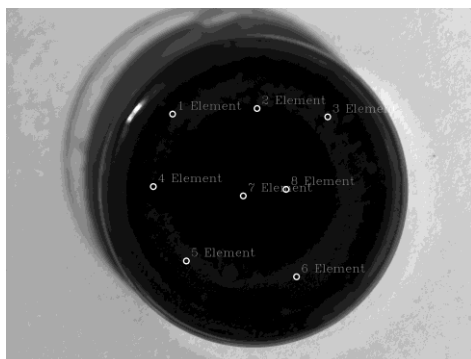


Figura 46 - A.V.Placa com o fungo 1- *Cladosporium cladosporioides* com a aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws, com a seleção de pontos;

Tabela 22 – A.V.Dados espectrais do fungo 1- *Cladosporium cladosporioides* com atuação de biocida 2 Algochene pronto ws;

Fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> com atuação do biocida Algochene pronto ws									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média (fungo não ativo)
0500 nm	0,06	0,04	0,06	0,05	0,04	0,04	0,06	0,04	0,05
0525 nm	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04
0550 nm	0,06	0,06	0,08	0,06	0,05	0,06	0,08	0,06	0,06
0575 nm	0,06	0,05	0,07	0,05	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05
0600 nm	0,05	0,05	0,07	0,05	0,04	0,05	0,07	0,05	0,05
0625 nm	0,07	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06
0650 nm	0,06	0,05	0,07	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
0675 nm	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
0700 nm	0,05	0,05	0,07	0,05	0,04	0,05	0,07	0,05	0,05
0750 nm	0,06	0,06	0,07	0,05	0,05	0,06	0,07	0,05	0,06
0800 nm	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,09	0,07	0,07
0850 nm	0,06	0,06	0,08	0,06	0,05	0,06	0,08	0,06	0,06
0900 nm	0,1	0,1	0,13	0,1	0,09	0,1	0,13	0,1	0,10
0950 nm	0,08	0,08	0,1	0,08	0,07	0,08	0,1	0,08	0,08
1000 nm	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,08	0,08

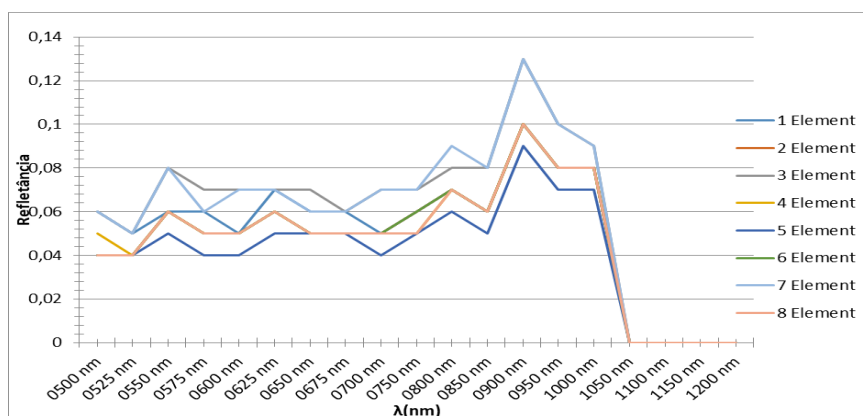


Figura 47 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa fungo 1- *Cladosporium cladosporioides* com aplicação de biocida 2 Algochene pronto ws;

- Fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides* com a aplicação do biocida 3 Cloreto Benzalcônico 50%, e seleção dos pontos (Elements).

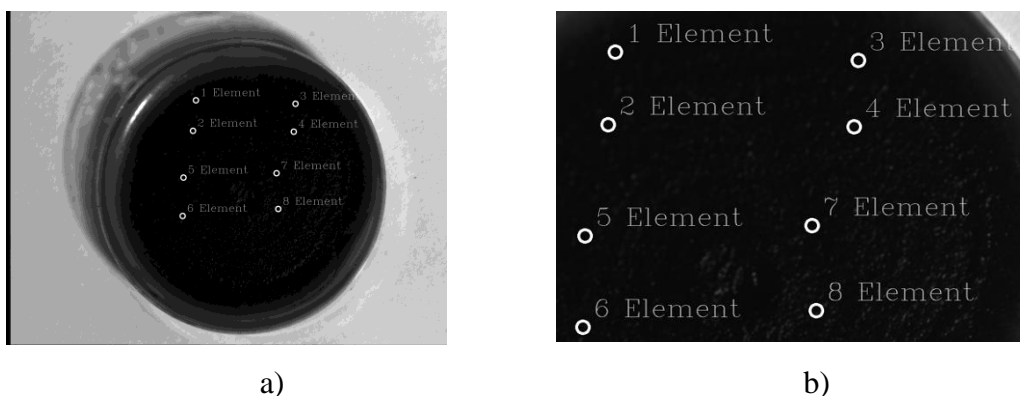


Figura 48 – A.V.Placa fungo 1- *Cladosporium cladosporioides* com a aplicação do biocida 3 Cloreto benzalcônico; b) Pormenor da seleção dos pontos;

Tabela 23 – A.V.Dados espectrais do fungo 1 *Cladosporium cladosporioides* com atuação de biocida 3 Cloreto benzalcônico 50%;

Fungo 1 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> com atuação do biocida Cloreto benzalcônico									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média (fungo não ativo)
0500 nm	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04
0525 nm	0,03	0,03	0,04	0,05	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
0550 nm	0,07	0,06	0,07	0,05	0,05	0,09	0,06	0,06	0,06
0575 nm	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,07	0,05
0600 nm	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,07	0,05
0625 nm	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,06
0650 nm	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,07	0,05
0675 nm	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05
0700 nm	0,06	0,05	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,07	0,06
0750 nm	0,07	0,06	0,06	0,06	0,09	0,08	0,06	0,12	0,07
0800 nm	0,09	0,06	0,07	0,06	0,09	0,08	0,06	0,11	0,08
0850 nm	0,11	0,08	0,09	0,08	0,1	0,08	0,08	0,11	0,09
0900 nm	0,11	0,08	0,09	0,08	0,1	0,09	0,09	0,12	0,09
0950 nm	0,1	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,12	0,09
1000 nm	0,12	0,11	0,11	0,11	0,1	0,12	0,11	0,15	0,11

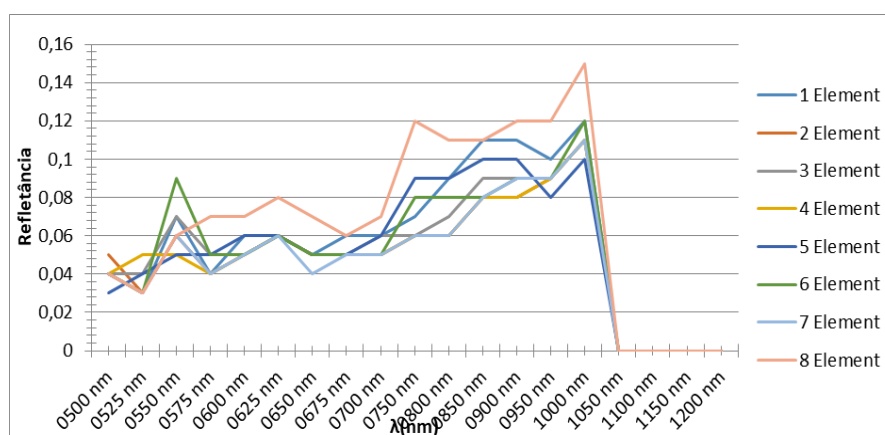


Figura 49 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa fungo 1 *Cladosporium cladosporioides* com aplicação de biocida 3 Cloreto benzalcônico 50%;

Tabela 24 – A.V.Quadro com as médias dos 8 pontos seleccionados nas placas de Petri com o fungo 1 - *Cladosporium cladosporioides*;

Média dos 8 pontos de cada placa de Petri do fungo 1:				
λ (nm)	Ativo/sem atuação de biocidas	Com atuação do biocida HMK R162	Com atuação do biocida Algochene pronto ws	Com atuação do biocida Cloreto benzalcónico
0500 nm	0,22	0,04	0,05	0,04
0525 nm	0,23	0,03	0,04	0,03
0550 nm	0,18	0,06	0,06	0,06
0575 nm	0,26	0,05	0,05	0,05
0600 nm	0,22	0,06	0,05	0,05
0625 nm	0,26	0,06	0,06	0,06
0650 nm	0,22	0,05	0,05	0,05
0675 nm	0,22	0,06	0,05	0,05
0700 nm	0,24	0,06	0,05	0,06
0750 nm	0,24	0,07	0,06	0,07
0800 nm	0,23	0,06	0,07	0,08
0850 nm	0,33	0,08	0,06	0,09
0900 nm	0,33	0,08	0,10	0,09
0950 nm	0,31	0,08	0,08	0,09
1000 nm	0,30	0,12	0,08	0,11

Tabela 25 – A.V.Correlações efectuadas entre as placas de Petri com o fungo 1 activo (vivo) e com as placas de Preti com o fungo 1 sujeito à atuação dos 3 biocidas: HMK R162, CB – Cloreto benzalcónico 50%; Alg: Algochene Pronto ws

Correlações das placas de Petri do fungo 1 entre:		
Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida HMK R162	Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida CB	Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida Alg
0,65	0,74	0,70

- Fungo 2 - *Epiconnum nigrum* sem aplicação de biocidas, seleção de pontos (Elements).

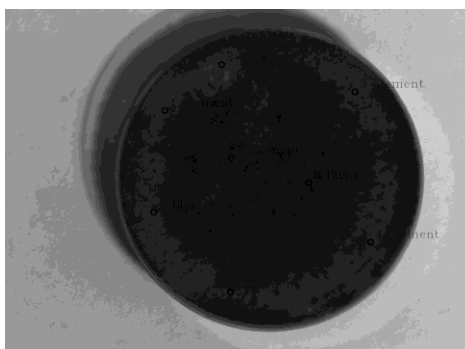


Figura 50 – A.V. Placa fungo 2 *Epiconnum nigrum* ativo sem aplicação de biocidas, com a seleção dos pontos (Elements);

Tabela 26 – A.V. Dados espectrais fungo 2 - *Epiconnum nigrum* ativo sem aplicação de biocidas;

Dados espectrais fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> ativo sem aplicação de biocidas									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,16	0,16	0,15	0,13	0,14	0,14	0,11	0,07	0,13
0525 nm	0,17	0,17	0,16	0,12	0,13	0,13	0,12	0,08	0,14
0550 nm	0,24	0,22	0,2	0,16	0,2	0,23	0,16	0,1	0,19
0575 nm	0,27	0,31	0,24	0,21	0,17	0,22	0,18	0,12	0,22
0600 nm	0,27	0,29	0,23	0,2	0,2	0,19	0,17	0,13	0,21
0625 nm	0,32	0,37	0,3	0,24	0,25	0,25	0,16	0,16	0,26
0650 nm	0,31	0,36	0,26	0,22	0,22	0,24	0,15	0,14	0,24
0675 nm	0,27	0,31	0,27	0,22	0,22	0,23	0,16	0,14	0,23
0700 nm	0,34	0,33	0,26	0,21	0,25	0,28	0,19	0,15	0,25
0750 nm	0,27	0,31	0,26	0,23	0,23	0,23	0,18	0,16	0,23
0800 nm	0,26	0,33	0,27	0,23	0,2	0,21	0,17	0,15	0,23
0850 nm	0,29	0,35	0,29	0,24	0,22	0,23	0,17	0,15	0,24
0900 nm	0,32	0,37	0,29	0,26	0,25	0,24	0,19	0,17	0,26
0950 nm	0,32	0,34	0,27	0,24	0,24	0,24	0,19	0,16	0,25
1000 nm	0,34	0,36	0,29	0,26	0,27	0,26	0,2	0,18	0,27

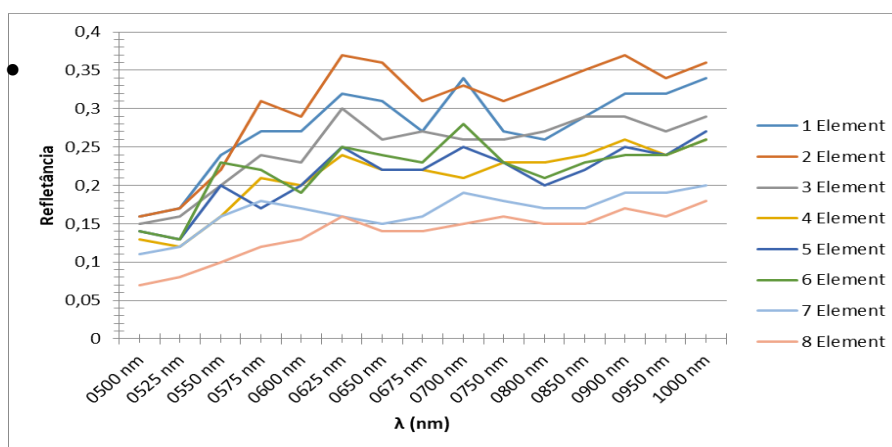


Figura 51 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 2 - *Epiconnum nigrum* sem aplicação de biocidas;

- Fungo 2 - *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida 1 HMK R162, com a seleção dos pontos (Elements):

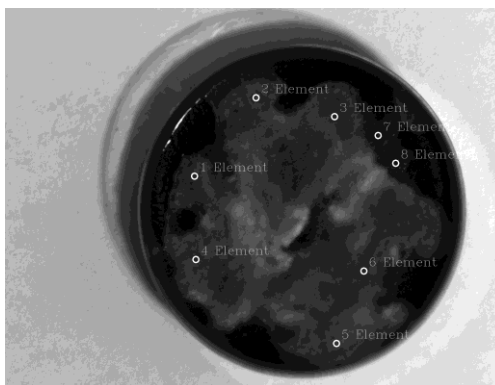


Figura 52 – A.V. Placa de Petri com o fungo 2 - *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida Hmk R162; seleção dos pontos (Elements).

Tabela 27 – A.V. Dados espectrais fungo 2-*Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida 1 HMK R162;

Dados espectrais do fungo 2 - <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida HMK R162K										
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média parte escura (não ativa)	Média parte branca (ativa)
0500 nm	0,15	0,21	0,14	0,15	0,21	0,17	0,15	0,1	0,13	0,17
0525 nm	0,17	0,23	0,14	0,17	0,21	0,18	0,15	0,12	0,14	0,18
0550 nm	0,23	0,27	0,2	0,22	0,29	0,23	0,21	0,17	0,19	0,24
0575 nm	0,22	0,28	0,2	0,21	0,28	0,23	0,35	0,17	0,26	0,24
0600 nm	0,25	0,29	0,22	0,25	0,3	0,25	0,37	0,22	0,30	0,26
0625 nm	0,26	0,3	0,22	0,25	0,31	0,25	0,41	0,22	0,32	0,27
0650 nm	0,23	0,27	0,2	0,21	0,27	0,23	0,38	0,2	0,29	0,24
0675 nm	0,22	0,28	0,2	0,21	0,27	0,23	0,36	0,22	0,29	0,24
0700 nm	0,24	0,29	0,21	0,22	0,28	0,25	0,4	0,24	0,32	0,25
0750 nm	0,23	0,3	0,21	0,21	0,28	0,23	0,29	0,26	0,28	0,24
0800 nm	0,32	0,4	0,28	0,28	0,38	0,31	0,46	0,38	0,42	0,33
0850 nm	0,32	0,39	0,27	0,27	0,35	0,28	0,4	0,38	0,39	0,31
0900 nm	0,27	0,35	0,24	0,24	0,31	0,26	0,33	0,34	0,34	0,28
0950 nm	0,33	0,4	0,3	0,29	0,37	0,33	0,47	0,42	0,45	0,34
1000 nm	0,35	0,42	0,33	0,32	0,38	0,34	0,47	0,44	0,46	0,36

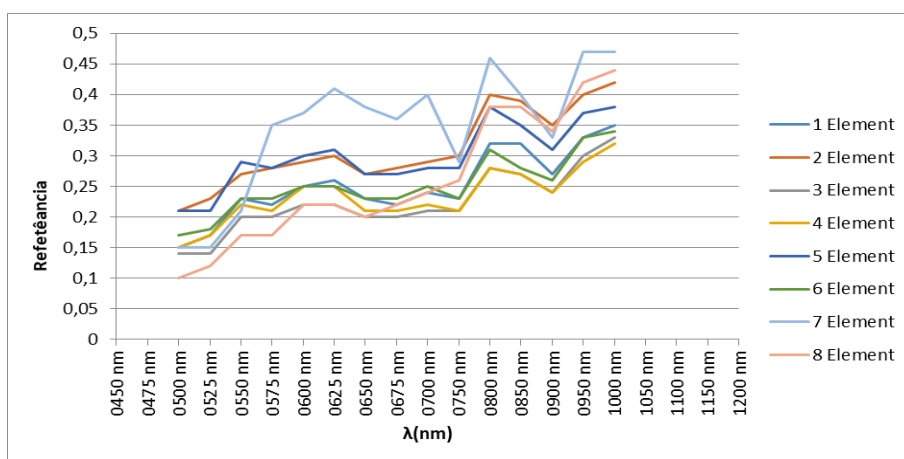


Figura 53 –A.V. Gráfico espectral relativo à placa fungo 2 - *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida 1 HMK R162;

- Fungo 2 - *Epiconnum nigrum* com a aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws, com a seleção dos pontos (Elements).

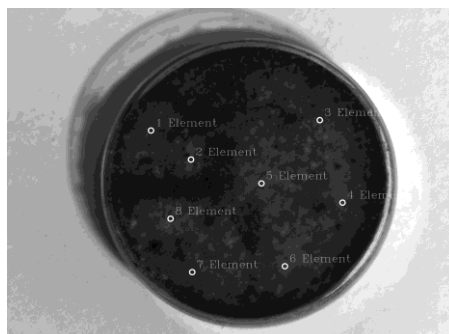


Figura 54 – A.V. Placa de Petri com o fungo 2 *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws; seleção dos pontos (Elements).

Tabela 28 – A.V. Dados espectrais fungos 2 – *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida 2 Algochene pronto;

Dados espectrais fungo 2 <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida Algochene pronto ws									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,05	0,06	0,06	0,07	0,06	0,08	0,06	0,06	0,06
0525 nm	0,16	0,16	0,17	0,18	0,22	0,21	0,14	0,16	0,18
0550 nm	0,19	0,19	0,19	0,21	0,24	0,25	0,16	0,19	0,20
0575 nm	0,20	0,20	0,22	0,23	0,27	0,27	0,17	0,20	0,22
0600 nm	0,20	0,18	0,20	0,21	0,24	0,24	0,17	0,18	0,20
0625 nm	0,22	0,21	0,24	0,25	0,27	0,29	0,19	0,20	0,23
0650 nm	0,20	0,19	0,21	0,23	0,23	0,25	0,17	0,18	0,21
0675 nm	0,19	0,17	0,21	0,23	0,24	0,25	0,18	0,17	0,21
0700 nm	0,21	0,18	0,21	0,25	0,24	0,26	0,19	0,18	0,22
0750 nm	0,22	0,17	0,22	0,25	0,23	0,26	0,20	0,17	0,22
0800 nm	0,21	0,15	0,20	0,24	0,21	0,25	0,21	0,16	0,20
0850 nm	0,26	0,19	0,24	0,30	0,24	0,30	0,26	0,19	0,25
0900 nm	0,33	0,24	0,32	0,38	0,31	0,37	0,33	0,24	0,32
0950 nm	0,29	0,22	0,27	0,34	0,29	0,34	0,28	0,22	0,28
1000 nm	0,35	0,28	0,34	0,40	0,35	0,41	0,34	0,27	0,34

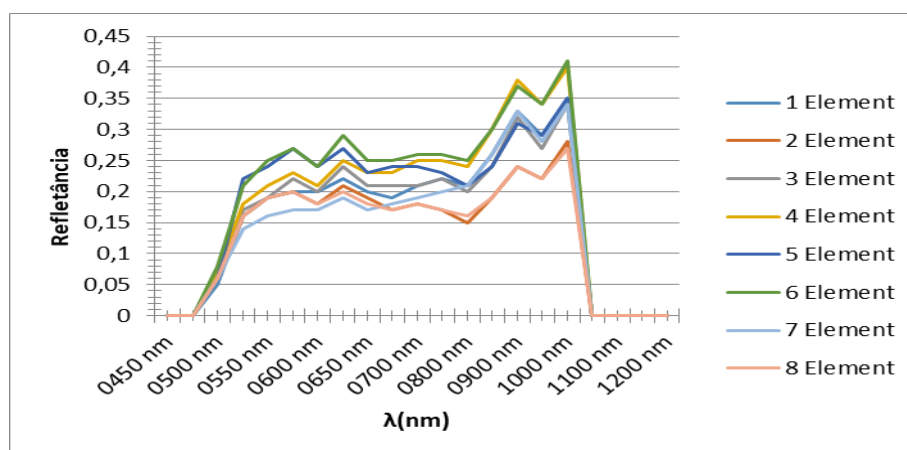


Figura 55 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa de fungo 2 *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws;

- Fungo 2 - *Epiconnum nigrum* com a aplicação do biocida 3 Cloreto Benzalcônico 50%, com a seleção dos pontos (Elements):

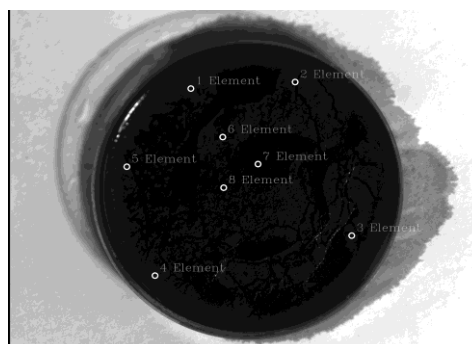


Figura 56 - A.V. Placa de Petri com o fungo 2 *Epiconnum nigrum* com a atuação do biocida 3 Cloreto benzalcônico 50%, com a seleção dos 8 pontos;

Tabela 29 – A.V. Dados espectrais fungo 2 – *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida Cloreto benzalcônico 50%;

Dados espectrais da placa de Petri com o fungo 2 <i>Epiconnum nigrum</i> com aplicação do biocida Cloreto benzalcônico									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06
0525 nm	0,08	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,04	0,05	0,06
0550 nm	0,10	0,07	0,08	0,10	0,08	0,07	0,06	0,07	0,08
0575 nm	0,09	0,06	0,07	0,09	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07
0600 nm	0,11	0,08	0,09	0,11	0,08	0,07	0,06	0,06	0,08
0625 nm	0,12	0,08	0,10	0,12	0,10	0,07	0,06	0,07	0,09
0650 nm	0,12	0,08	0,10	0,12	0,10	0,06	0,05	0,06	0,09
0675 nm	0,14	0,10	0,12	0,13	0,11	0,06	0,06	0,06	0,10
0700 nm	0,16	0,12	0,15	0,16	0,15	0,07	0,06	0,07	0,12
0750 nm	0,27	0,20	0,25	0,28	0,26	0,12	0,11	0,11	0,20
0800 nm	0,29	0,22	0,27	0,31	0,31	0,14	0,13	0,13	0,23
0850 nm	0,34	0,26	0,32	0,36	0,36	0,18	0,17	0,18	0,27
0900 nm	0,40	0,33	0,38	0,43	0,47	0,27	0,25	0,26	0,35
0950 nm	0,32	0,27	0,32	0,35	0,37	0,23	0,22	0,23	0,29
1000 nm	0,32	0,28	0,31	0,35	0,38	0,25	0,23	0,25	0,30

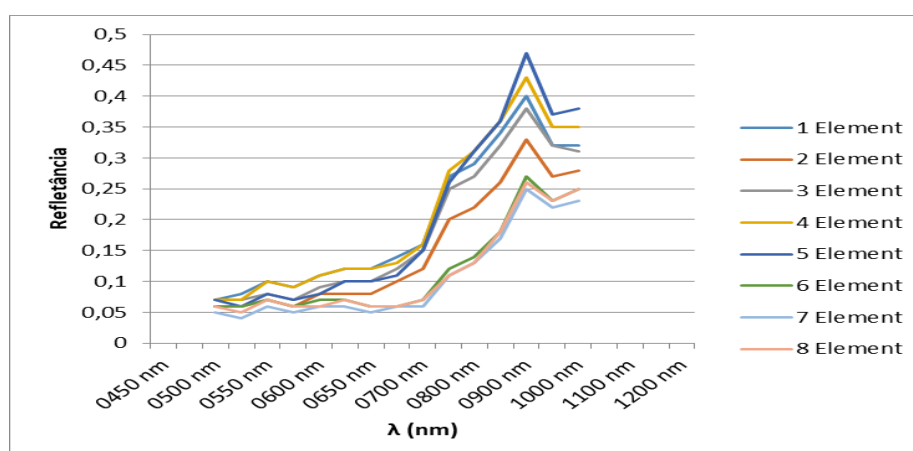


Figura 57 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa de fungo 2 *Epiconnum nigrum* com aplicação do biocida Cloreto benzalcônico 50%;

Tabela 30 - A.V. Quadro com as médias dos 8 pontos selecionados nas placas de Petri com o fungo 2 - *Epiconnum nigrum*;

Médias dos 8 pontos da placa de Petri com o fungo 2:				
λ (nm)	Ativo/sem atuação de biocidas	Com atuação do biocida HMK R162	Com atuação do biocida Algochene pronto ws	Com atuação do biocida Cloreto benzalcônico
0500 nm	0,13	0,13	0,06	0,06
0525 nm	0,14	0,14	0,18	0,06
0550 nm	0,19	0,19	0,20	0,08
0575 nm	0,22	0,26	0,22	0,07
0600 nm	0,21	0,30	0,20	0,08
0625 nm	0,26	0,32	0,23	0,09
0650 nm	0,24	0,29	0,21	0,09
0675 nm	0,23	0,29	0,21	0,10
0700 nm	0,25	0,32	0,22	0,12
0750 nm	0,23	0,28	0,22	0,20
0800 nm	0,23	0,42	0,20	0,23
0850 nm	0,24	0,39	0,25	0,27
0900 nm	0,26	0,34	0,32	0,35
0950 nm	0,25	0,45	0,28	0,29
1000 nm	0,27	0,46	0,34	0,30

Tabela 31 – A.V. Correlações efetuadas entre as placas de Petri com o fungo 2 ativo (vivo) e com as placas de Preti com o fungo 2 sujeito à atuação dos 3 biocidas: HMK R162, CB – Cloreto benzalcônico 50%; Alg: Algochene Pronto ws

Correlações das placas de Petri do fungo 2 entre:		
Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida HMK R162	Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida CB	Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida Alg
0,85	0,62	0,82

- Fungo 3 - *Cladosporium Sp.* sem aplicação de biocidas, com a seleção dos pontos (Elements):

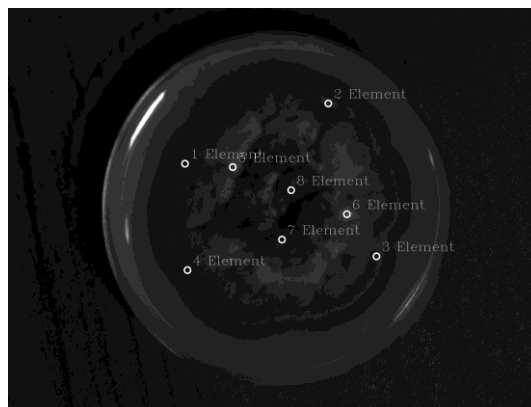


Figura 58 – Placa de Petri com o fungo 3 *Cladosporium Sp.* sem aplicação de biocidas, com a seleção dos 8 pontos;

Tabela 32 - Dados espectrais fungo 3 *Cladosporium Sp.*, sem aplicação de biocidas;

Dados espectrais da placa de Preti com o fungo 3 <i>Cladosporium sp.</i> sem atuação de biocidas									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Media
0500 nm	0,42	0,56	0,52	0,45	0,85	1,00	0,50	0,38	0,59
0525 nm	0,10	0,10	0,14	0,10	0,20	0,19	0,10	0,16	0,14
0550 nm	0,12	0,11	0,14	0,12	0,22	0,19	0,11	0,17	0,15
0575 nm	0,13	0,12	0,17	0,13	0,23	0,22	0,11	0,19	0,16
0600 nm	0,12	0,15	0,15	0,14	0,22	0,21	0,11	0,17	0,16
0625 nm	0,14	0,16	0,17	0,15	0,25	0,23	0,12	0,17	0,17
0650 nm	0,12	0,13	0,15	0,13	0,21	0,20	0,11	0,16	0,15
0675 nm	0,12	0,13	0,15	0,13	0,20	0,21	0,11	0,15	0,15
0700 nm	0,14	0,14	0,17	0,15	0,22	0,23	0,11	0,16	0,17
0750 nm	0,15	0,13	0,17	0,15	0,22	0,23	0,12	0,17	0,17
0800 nm	0,21	0,18	0,25	0,20	0,32	0,31	0,16	0,23	0,23
0850 nm	0,14	0,12	0,18	0,14	0,22	0,21	0,11	0,16	0,16
0900 nm	0,25	0,23	0,32	0,24	0,40	0,37	0,20	0,29	0,29
0950 nm	0,18	0,15	0,23	0,18	0,29	0,26	0,15	0,22	0,21
1000 nm	0,23	0,18	0,28	0,23	0,35	0,33	0,19	0,27	0,26

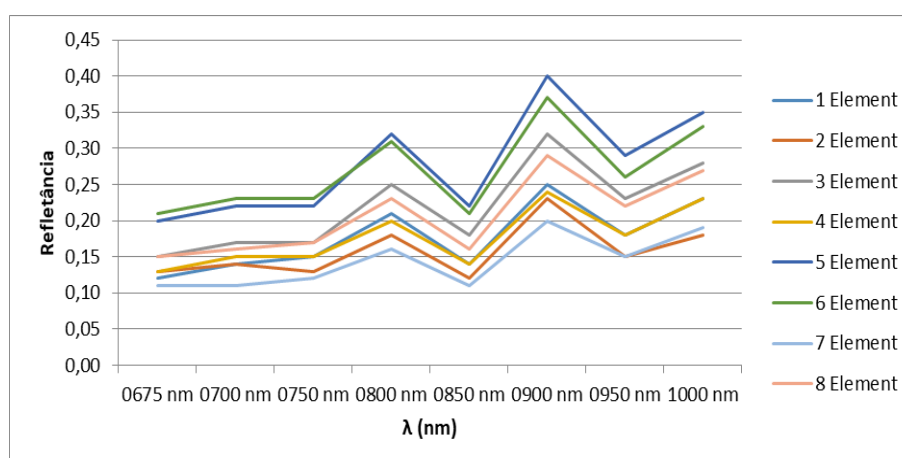


Figura 59 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa de fungo 3 *Cladosporium Sp.* sem aplicação de biocidas ;

- Fungo 3 - *Cladosporium* sp. com a aplicação do biocida 1 HMK R162, com a seleção dos pontos (Elements):

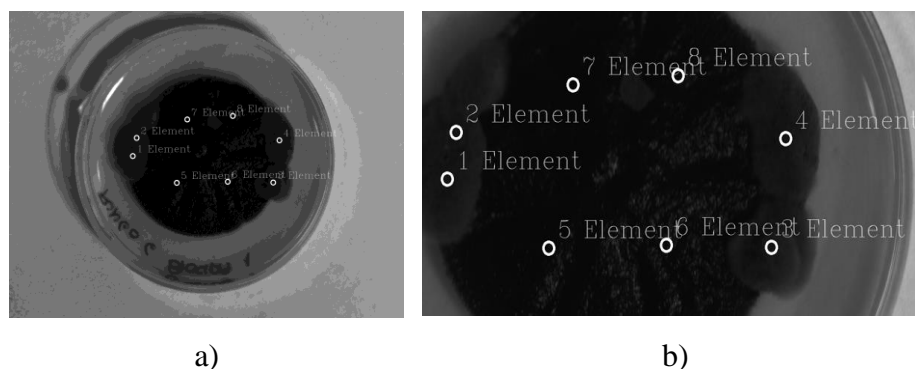


Figura 60 – A.V. Placa fungo 3 *Cladosporium* Sp com a aplicação do biocida 1 HMK R162; b) Pormenor da seleção dos pontos;

Tabela 33 – A.V. Dados espectrais fungo 3 *Cladosporium* Sp, com aplicação do biocida HMK R162;

Dados espectrais da placa de Petri com o fungo 3 <i>Cladosporium</i> sp com a atuação do biocida Algochene pronto ws:										
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média dos pontos da parte ativa do fungo	Média dos pontos da parte não ativa do fungos
0500 nm	0,08	0,09	0,09	0,08	0,05	0,04	0,03	0,03	0,09	0,04
0525 nm	0,08	0,09	0,09	0,08	0,05	0,03	0,03	0,03	0,09	0,04
0550 nm	0,14	0,15	0,14	0,13	0,08	0,07	0,05	0,06	0,14	0,07
0575 nm	0,12	0,13	0,12	0,11	0,06	0,05	0,04	0,04	0,12	0,05
0600 nm	0,16	0,16	0,15	0,14	0,09	0,06	0,05	0,07	0,15	0,07
0625 nm	0,15	0,17	0,15	0,13	0,08	0,06	0,05	0,06	0,15	0,06
0650 nm	0,13	0,14	0,13	0,12	0,07	0,05	0,04	0,05	0,13	0,05
0675 nm	0,14	0,14	0,13	0,12	0,07	0,06	0,04	0,05	0,13	0,06
0700 nm	0,15	0,15	0,14	0,13	0,07	0,06	0,05	0,05	0,14	0,06
0750 nm	0,15	0,16	0,15	0,13	0,08	0,06	0,05	0,06	0,15	0,06
0800 nm	0,19	0,20	0,19	0,16	0,10	0,07	0,06	0,07	0,19	0,08
0850 nm	0,21	0,21	0,20	0,17	0,10	0,08	0,06	0,07	0,20	0,08
0900 nm	0,19	0,19	0,18	0,16	0,09	0,08	0,06	0,07	0,18	0,08
0950 nm	0,18	0,18	0,17	0,14	0,09	0,08	0,06	0,06	0,17	0,07
1000 nm	0,21	0,20	0,20	0,16	0,10	0,08	0,07	0,08	0,19	0,08

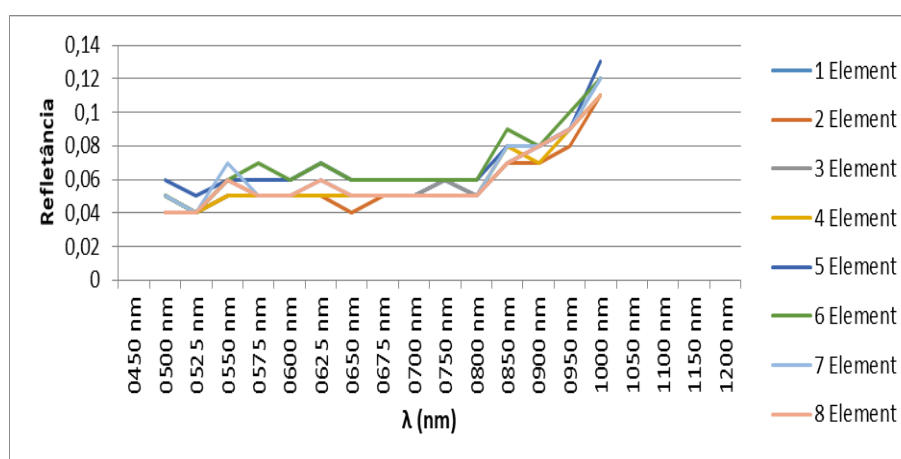
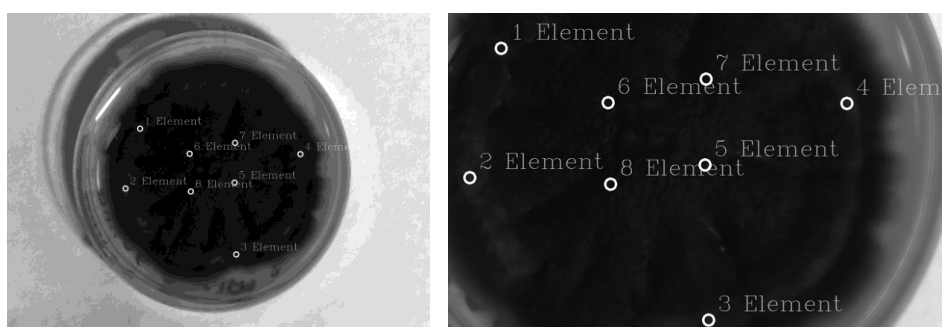


Figura 61 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa de fungo 3 *Cladosporium* Sp. com aplicação do biocida 1 HMK R162;

- Fungo 3 - *Cladosporium* Sp. com a aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws, com a seleção dos pontos (Elements):



a)

b)

Figura 62 – A.V. Placa fungo 3 com a aplicação do biocida 2 - Algochene pronto ws; b) Pormenor da seleção dos pontos;

Tabela 34 – A.V. Dados espectrais fungo 3 - *Cladosporium* Sp, com aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws;

Dados espectrais da placa de petri com o fungo 3 <i>Cladosporium</i> sp. com a atuação do biocida Algochene pronto ws									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,09	0,12	0,12	0,14	0,09	0,07	0,06	0,05	0,09
0525 nm	0,08	0,12	0,12	0,13	0,07	0,06	0,06	0,05	0,09
0550 nm	0,10	0,14	0,13	0,14	0,09	0,08	0,07	0,06	0,10
0575 nm	0,10	0,13	0,14	0,12	0,09	0,08	0,07	0,05	0,10
0600 nm	0,10	0,13	0,14	0,12	0,07	0,08	0,07	0,06	0,10
0625 nm	0,10	0,13	0,14	0,12	0,07	0,08	0,06	0,06	0,10
0650 nm	0,09	0,11	0,12	0,11	0,05	0,08	0,05	0,05	0,08
0675 nm	0,10	0,12	0,14	0,12	0,06	0,08	0,06	0,06	0,09
0700 nm	0,10	0,15	0,12	0,17	0,11	0,09	0,07	0,05	0,11
0750 nm	0,11	0,15	0,14	0,17	0,10	0,09	0,07	0,05	0,11
0800 nm	0,11	0,16	0,16	0,18	0,11	0,09	0,08	0,06	0,12
0850 nm	0,08	0,11	0,12	0,13	0,08	0,07	0,06	0,05	0,09
0900 nm	0,12	0,16	0,16	0,18	0,12	0,11	0,09	0,08	0,13
0950 nm	0,14	0,19	0,21	0,22	0,14	0,12	0,11	0,09	0,15
1000 nm	0,17	0,23	0,24	0,25	0,16	0,14	0,13	0,11	0,18

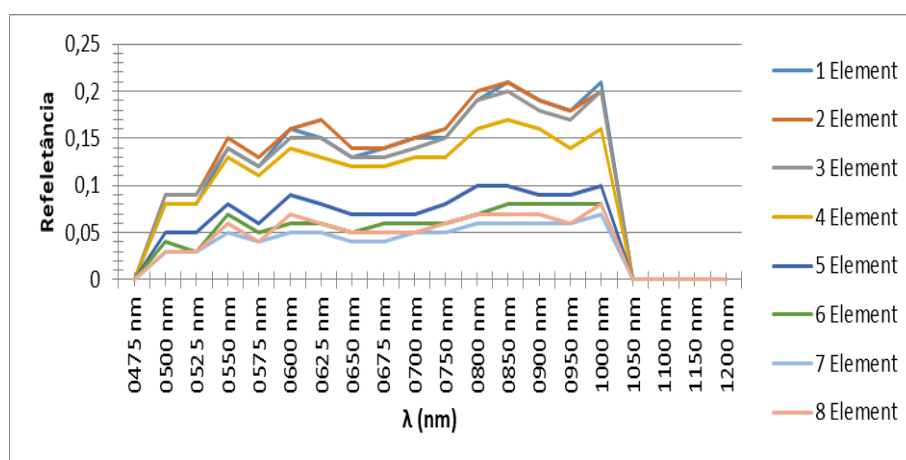


Figura 63 – A.V.Gráfico espectral relativo à placa de fungo 3 - *Cladosporium* Sp. com aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws ;

- Fungo 3 - *Cladosporium Sp* com aplicação do biocida 3 Cloreto benzalcônico 50%, com a seleção dos pontos (Elements):

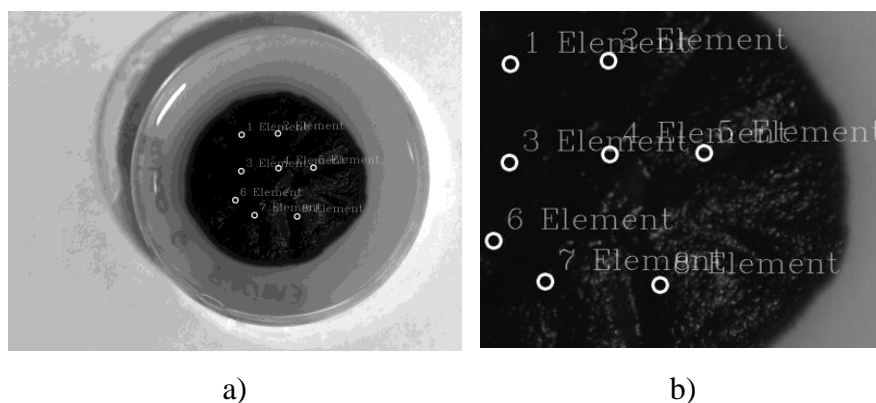


Figura 64 – A.V.Placa fungo 3 com a aplicação do biocida 3 – Cloreto benzalcônico 50%; b) Pormenor da seleção dos pontos;

Tabela 35 – A.V.Dados espectrais fungo 3 - *Cladosporium Sp*, com aplicação do biocida 3 Cloreto benzalcônico;

Dados espectrais da placa de Petri com o fungo 3 <i>Cladosporium Sp</i> . com atuação do biocida Cloreto benzalcônico									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,05	0,04	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05
0525 nm	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
0550 nm	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06
0575 nm	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07	0,05	0,05	0,05
0600 nm	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
0625 nm	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06
0650 nm	0,05	0,04	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
0675 nm	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
0700 nm	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
0750 nm	0,06	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06
0800 nm	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
0850 nm	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,08
0900 nm	0,08	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0950 nm	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09	0,09
1000 nm	0,12	0,11	0,11	0,11	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12

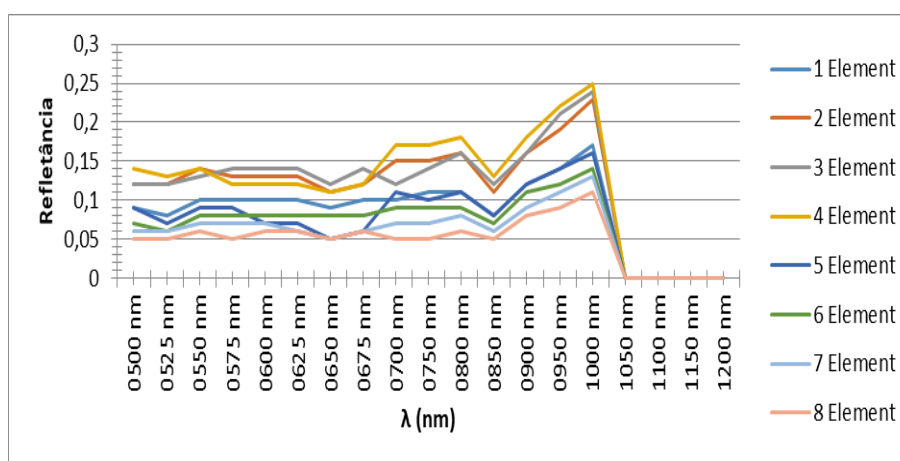


Figura 65 – A.V. Gráfico espectral relativo à placa de Petri com o fungo 3 *Cladosporium Sp* com aplicação do biocida 3 Cloreto benzalcônico 50% ;

Tabela 36 – A.V. Quadro com as médias dos 8 pontos selecionados nas placas de Petri com o fungo 3 - *Cladosporium Sp.*;

Média dos 8 pontos de cada placa de Petri do fungo 3:				
λ (nm)	Ativo/ sem atuação de biocidas	Com atuação do biocida HMK R162	Com atuação do biocida Algochene pronto ws	Com atuação do biocida Cloreto benzalcónico
0500 nm	0,59	0,04	0,09	0,05
0525 nm	0,14	0,04	0,09	0,04
0550 nm	0,15	0,07	0,09	0,06
0575 nm	0,16	0,05	0,09	0,05
0600 nm	0,16	0,07	0,09	0,05
0625 nm	0,17	0,06	0,09	0,06
0650 nm	0,15	0,05	0,09	0,05
0675 nm	0,15	0,06	0,09	0,05
0700 nm	0,17	0,06	0,09	0,05
0750 nm	0,17	0,06	0,09	0,06
0800 nm	0,23	0,08	0,09	0,05
0850 nm	0,16	0,08	0,09	0,08
0900 nm	0,29	0,08	0,09	0,08
0950 nm	0,21	0,07	0,09	0,09
1000 nm	0,26	0,08	0,09	0,12

Tabela 37 – A.V. Correlações efetuadas entre as placas de Petri com o fungo 3 ativo (vivo) e com as placas de Petri com o fungo 3 sujeito à atuação dos 3 biocidas: HMK R162; CB – Cloreto benzalcónico 50%; Alg: Algochene Pronto ws;

Correlações das placas de Petri do fungo 3 entre:		
Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida HMK R162	Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida CB	Sem aplicação de biocida/com aplicação de biocida Alg
-0,19	0,08	0,08

Anexo VI

(Dados espectrais – Pedras dolomíticas)

Dados espectrais – Rochas Dolomíticas

- Rocha dolomítica sem aplicação de biocidas, e seleção de pontos (Elements):

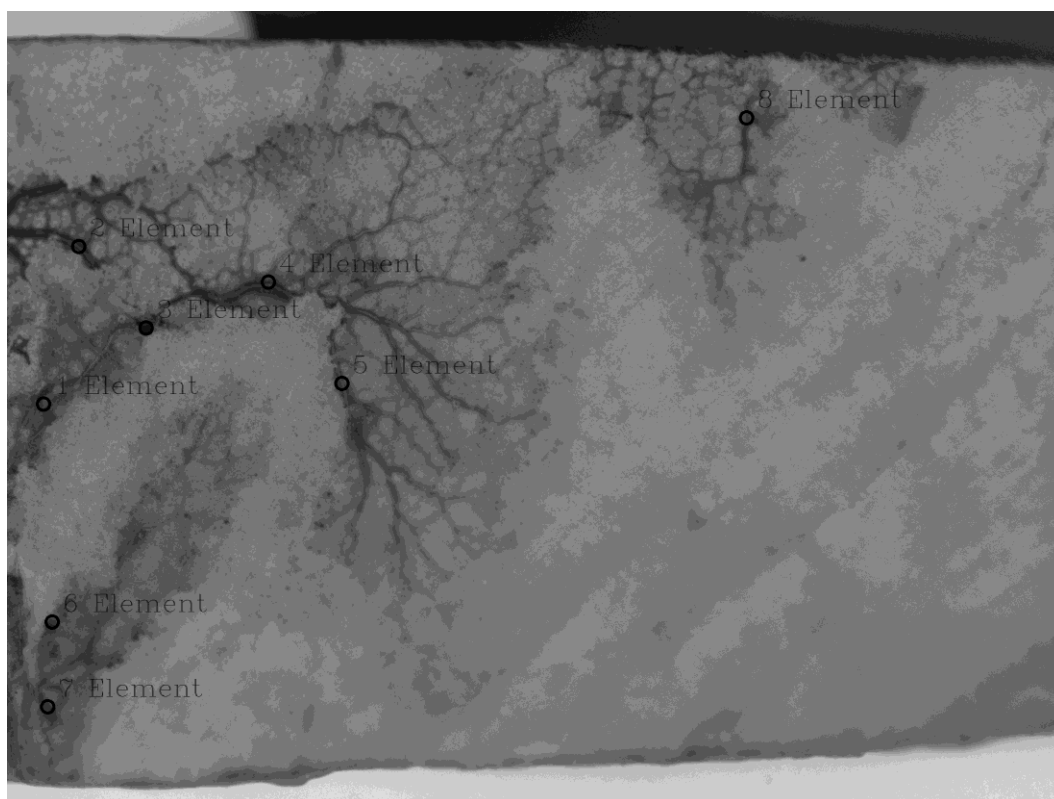


Figura 66-A.VI. Rocha dolomítica sem aplicação de biocidas;

Tabela 38 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica sem aplicação de biocidas;

Dados espectrais da rocha dolomítica sem aplicação de biocidas									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,28	0,2	0,09	0,18	0,26	0,21	0,21	0,24	0,21
0525 nm	0,31	0,21	0,08	0,2	0,29	0,23	0,22	0,28	0,23
0550 nm	0,29	0,22	0,1	0,21	0,28	0,24	0,23	0,29	0,23
0575 nm	0,4	0,27	0,11	0,27	0,39	0,29	0,28	0,39	0,30
0600 nm	0,21	0,14	0,06	0,16	0,22	0,15	0,15	0,22	0,16
0625 nm	0,28	0,2	0,08	0,2	0,27	0,21	0,21	0,29	0,22
0650 nm	0,29	0,21	0,09	0,22	0,3	0,22	0,23	0,3	0,23
0675 nm	0,31	0,22	0,09	0,23	0,3	0,24	0,24	0,31	0,24
0700 nm	0,33	0,24	0,09	0,25	0,32	0,27	0,27	0,33	0,26
0750 nm	0,33	0,28	0,12	0,29	0,34	0,31	0,32	0,37	0,30
0800 nm	0,33	0,26	0,1	0,29	0,35	0,29	0,3	0,33	0,28
0850 nm	0,5	0,41	0,16	0,43	0,51	0,42	0,44	0,49	0,42
0900 nm	0,46	0,39	0,15	0,4	0,5	0,39	0,42	0,47	0,40
0950 nm	0,33	0,27	0,11	0,3	0,34	0,29	0,32	0,32	0,29
1000 nm	0,31	0,27	0,12	0,29	0,35	0,31	0,32	0,38	0,29

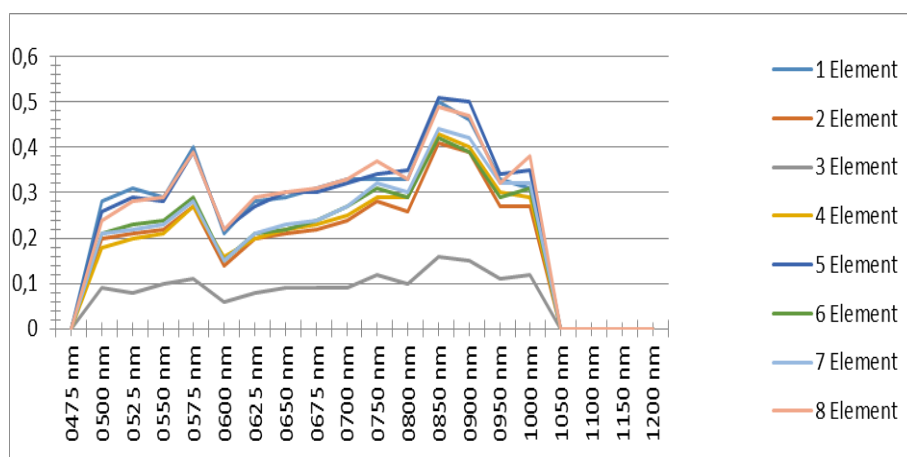


Figura 67- A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomítica sem aplicação de biocidas;

- Rocha dolomítica com aplicação do biocida 1 HMK R162, e seleção de pontos (Elements):

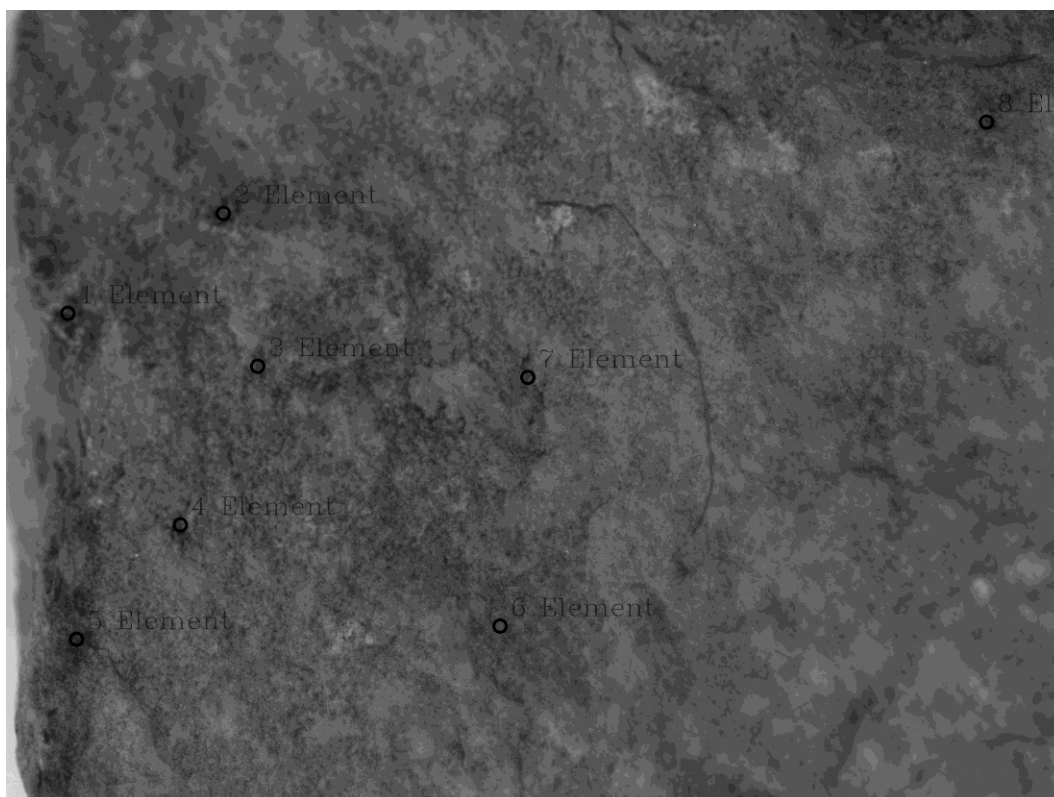


Figura 68 – A.VI. Rocha dolomítica com aplicação do biocida 1 HMK R162;

Tabela 39 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica com aplicação do biocida 1 HMK R162;

Dados espectrais da rocha dolomítica com aplicação do biocida HMK R162K									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,2	0,21	0,21	0,24	0,18	0,31	0,22	0,18	0,22
0525 nm	0,21	0,24	0,2	0,25	0,18	0,33	0,22	0,22	0,23
0550 nm	0,21	0,23	0,2	0,24	0,19	0,32	0,21	0,19	0,22
0575 nm	0,24	0,25	0,2	0,28	0,19	0,35	0,2	0,2	0,24
0600 nm	0,29	0,3	0,22	0,31	0,21	0,37	0,23	0,26	0,27
0625 nm	0,29	0,32	0,24	0,33	0,23	0,42	0,25	0,24	0,29
0650 nm	0,31	0,36	0,26	0,37	0,26	0,48	0,29	0,25	0,32
0675 nm	0,34	0,38	0,25	0,38	0,25	0,46	0,3	0,28	0,33
0700 nm	0,19	0,2	0,14	0,2	0,14	0,24	0,15	0,15	0,18
0750 nm	0,4	0,44	0,32	0,47	0,31	0,57	0,35	0,33	0,40
0800 nm	0,4	0,45	0,31	0,47	0,3	0,51	0,33	0,35	0,39
0850 nm	0,46	0,51	0,38	0,53	0,35	0,57	0,39	0,39	0,45
0900 nm	0,44	0,51	0,37	0,5	0,34	0,54	0,38	0,41	0,44
0950 nm	0,4	0,43	0,29	0,42	0,28	0,44	0,32	0,37	0,37
1000 nm	0,34	0,37	0,26	0,39	0,25	0,38	0,27	0,32	0,32

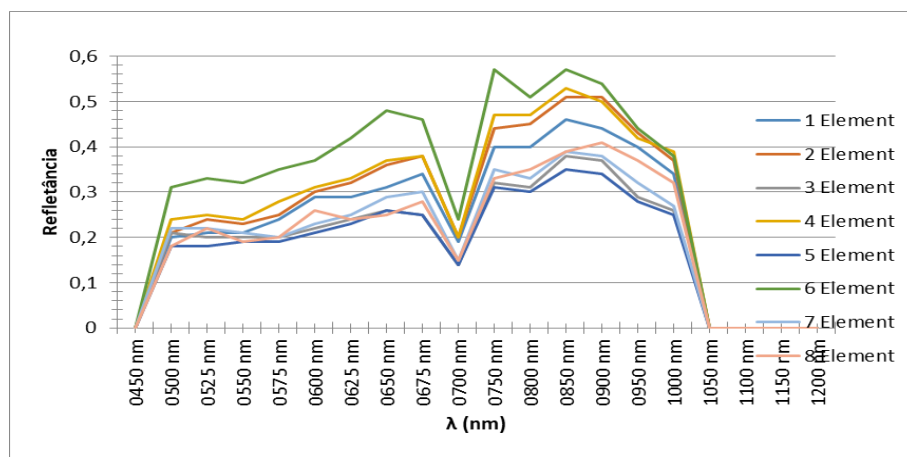


Figura 69- A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomítica com aplicação do biocida 1 HMK R162;

- Rocha dolomítica com aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws, e seleção de pontos (Elements):

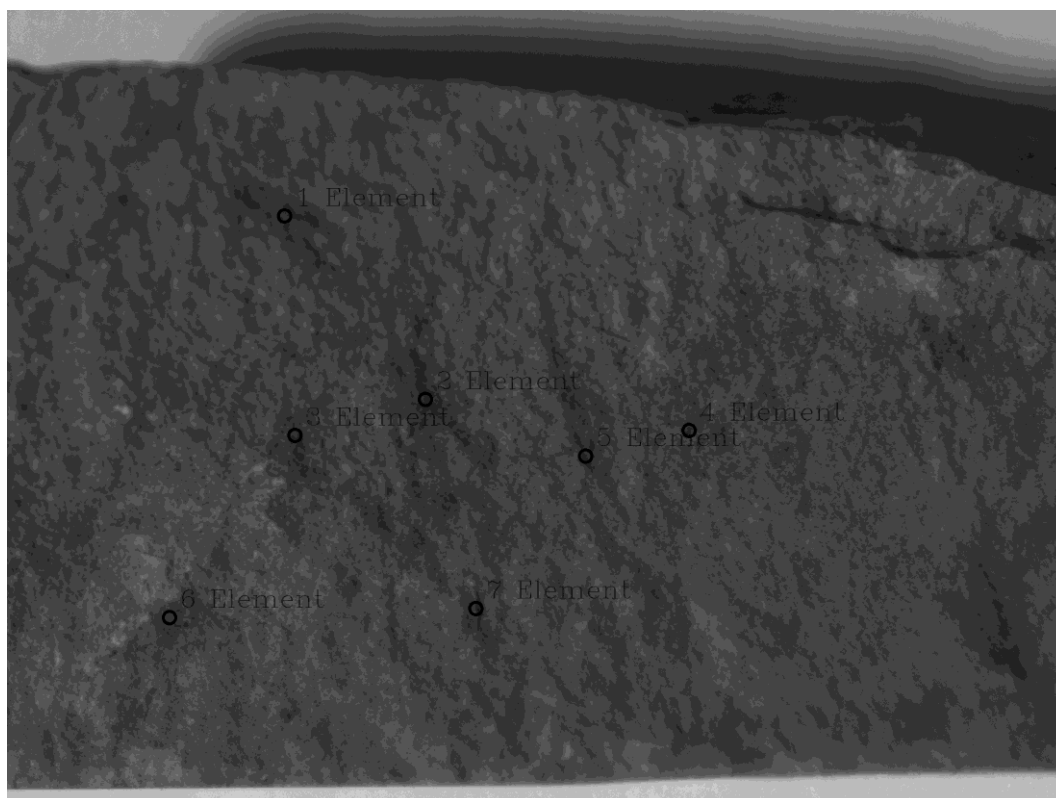


Figura 70 – A.VI. Rocha dolomítica com aplicação do biocida 2 Algochene pronto ws;

Tabela 40 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica com atuação do biocida 2 Algochene pronto ws;

Dados espectrais da rocha dolomítica com atuação do biocida Algochene pronto ws								
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Média
0500 nm	0,19	0,18	0,2	0,17	0,18	0,22	0,16	0,19
0525 nm	0,23	0,19	0,21	0,19	0,19	0,27	0,16	0,21
0550 nm	0,23	0,19	0,2	0,2	0,19	0,3	0,16	0,21
0575 nm	0,33	0,26	0,29	0,28	0,26	0,44	0,23	0,30
0600 nm	0,19	0,16	0,17	0,17	0,15	0,27	0,13	0,18
0625 nm	0,31	0,26	0,28	0,27	0,24	0,45	0,19	0,29
0650 nm	0,34	0,27	0,28	0,29	0,27	0,47	0,2	0,30
0675 nm	0,34	0,27	0,29	0,29	0,26	0,49	0,2	0,31
0700 nm	0,38	0,29	0,3	0,3	0,27	0,53	0,21	0,33
0750 nm	0,4	0,31	0,32	0,35	0,3	0,55	0,26	0,36
0800 nm	0,39	0,31	0,3	0,34	0,29	0,51	0,23	0,34
0850 nm	0,29	0,22	0,22	0,24	0,21	0,36	0,16	0,24
0900 nm	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,10
0950 nm	0,36	0,3	0,29	0,32	0,28	0,51	0,23	0,33
1000 nm	0,29	0,23	0,23	0,27	0,23	0,35	0,19	0,26

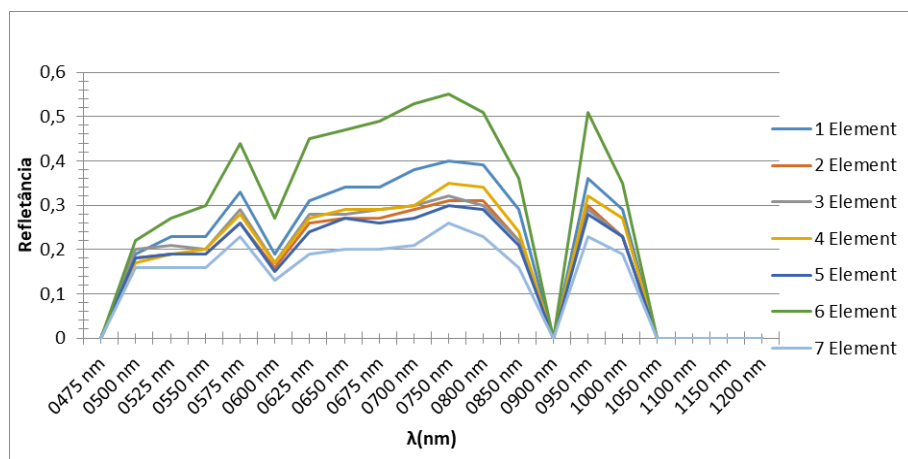


Figura 71- A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomítica com aplicação de biocida 2 Algochene pronto ws;

- Rocha dolomítica com aplicação do biocida Cloreto benzalcónico, e seleção de pontos (Elements):



Figura 72 – A.VI. Rocha dolomítica com aplicação do biocida 3 Cloreto benzalcónico;

Tabela 41 – A.VI. Dados espectrais da rocha dolomítica com atuação do biocida 3 Cloreto benzalcónico;

Dados espectrais da rocha dolomítica com atuação do biocida Cloreto benzalcónico									
λ (nm)	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Média
0500 nm	0,2	0,21	0,2	0,12	0,19	0,11	0,15	0,13	0,16
0525 nm	0,24	0,23	0,23	0,12	0,22	0,11	0,15	0,15	0,18
0550 nm	0,22	0,24	0,24	0,15	0,24	0,12	0,16	0,16	0,19
0575 nm	0,33	0,33	0,32	0,16	0,31	0,14	0,19	0,21	0,25
0600 nm	0,21	0,21	0,19	0,1	0,19	0,09	0,11	0,13	0,15
0625 nm	0,25	0,27	0,24	0,13	0,25	0,11	0,16	0,18	0,20
0650 nm	0,27	0,29	0,25	0,15	0,26	0,12	0,15	0,2	0,21
0675 nm	0,29	0,3	0,25	0,15	0,26	0,12	0,16	0,2	0,22
0700 nm	0,32	0,33	0,28	0,15	0,28	0,14	0,18	0,23	0,24
0750 nm	0,35	0,35	0,29	0,17	0,31	0,16	0,19	0,24	0,26
0800 nm	0,34	0,35	0,29	0,17	0,3	0,16	0,18	0,23	0,25
0850 nm	0,47	0,49	0,43	0,25	0,39	0,24	0,28	0,34	0,36
0900 nm	0,48	0,46	0,39	0,24	0,38	0,25	0,28	0,31	0,35
0950 nm	0,36	0,34	0,3	0,17	0,28	0,19	0,2	0,24	0,26
1000 nm	0,53	0,46	0,38	0,26	0,35	0,24	0,27	0,32	0,35

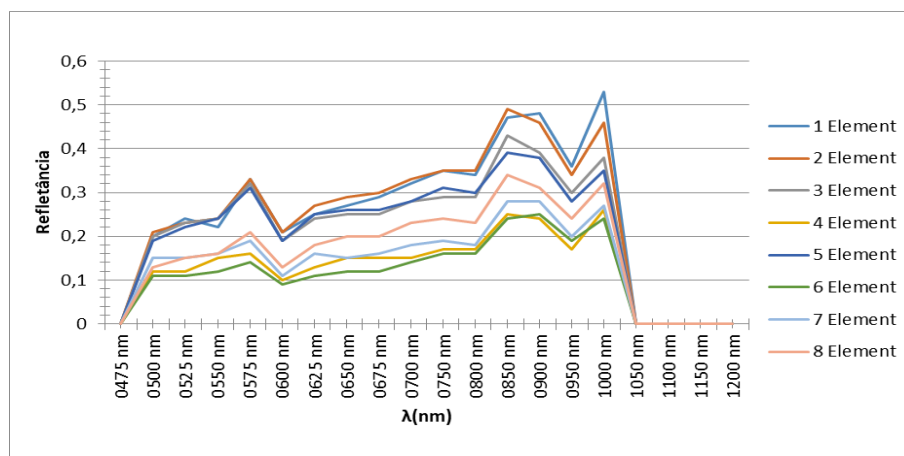


Figura 73- A.VI. Gráfico espectral relativo à rocha dolomítica com aplicação de biocida 3 Cloreto benzalcônico;

Anexos VII

(Fichas Técnicas dos biocidas selecionados:
Algochene pronto ws, Cloreto benzalcónico 50 % e HMK R162)